

# 胚芽干细胞研究：现在与未来

## Embryonic Stem Cell Research: Present and Future

文信容

汉城大学医学院 教授

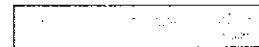
Moon Shinyong

*Professor, College of Medicine, Seoul National University*

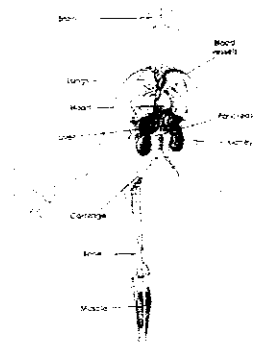
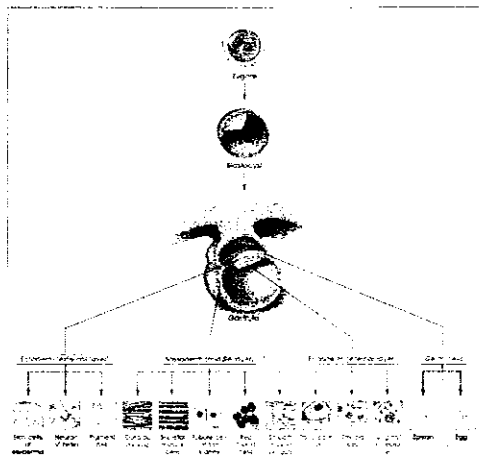
# 胚芽干细胞研究：现在与未来

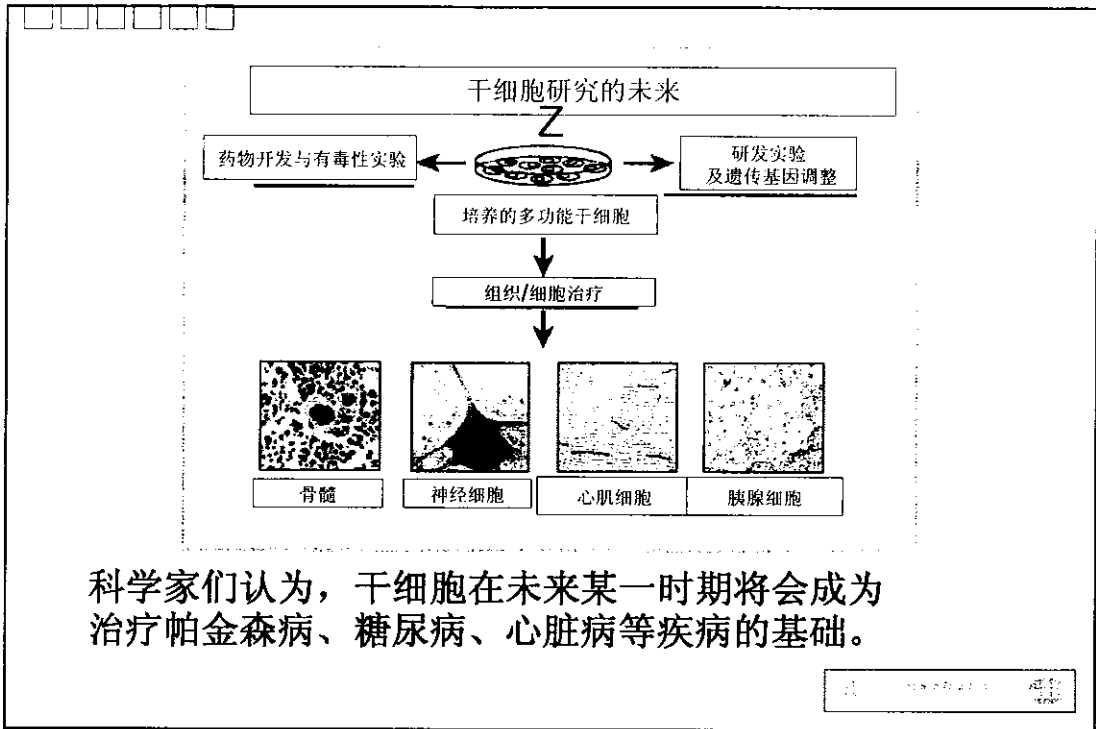
治疗目的复制的现状

医学博士文信容  
首尔大学医学院妇产科



## 胚芽干细胞研究的目的

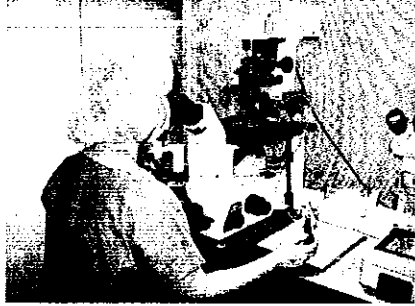




## 胚芽干细胞：法律、伦理方面的考虑

- 正常的妊娠及出生
- 胚芽干细胞相对成人干细胞，在临床上更具未来性，但因伦理问题，相关研究一直未能顺利进行。
- 一些人认为人类胚芽细胞具有与新生儿或成人胚芽相当的道德价值，因此认为所有的与胚芽相关研究在伦理上都是无法接受的。
- 但更多的人认为即使存在价值观问题，胚芽终将废弃，明知胚芽干细胞是治疗特定疾病的最佳方法而不去使用它才是真正有失道德。

## 从试管人工授精到人类胚芽干细胞的复制



1. 试管人工授精和胚芽移植(IVF-ET)项目(1985)
2. 冷冻保存
3. 辅助孵化论
4. 细胞质内精子直接注入术
5. 着床前基因检查
6. 完全胚芽培养系统
7. 人类胚芽干细胞
- (2001.9~) : SNUhES 1,2,3,4
8. 复制的人类胚芽干细胞 (2004)

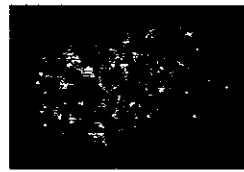
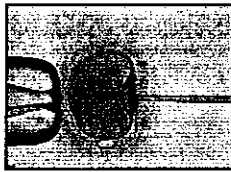
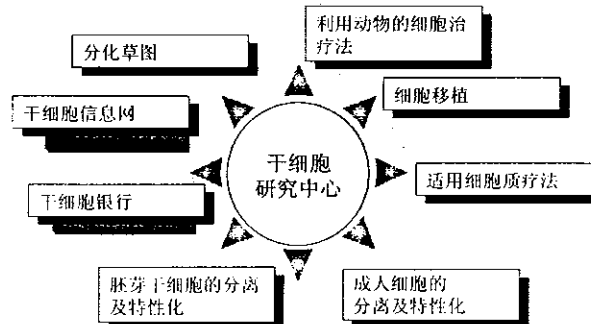


Figure 1. SNUhES 1, 2, 3, 4

## 干细胞研究中心(韩国)



www.stem.or.kr



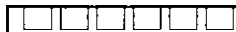
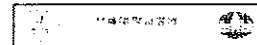
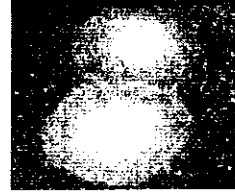
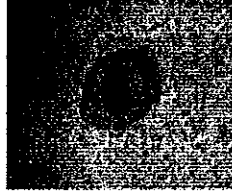
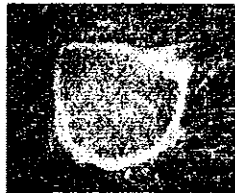
- 创建: 2002年7月
- 研究基金: 705万美元 (每年)
- 后援: 科学技术部
- 地址: 首尔大学医院

Figure 2. Stem Cell Research Center

# 人类胚芽干细胞银行(2002)

## KSCRC 登记的干细胞株

- 完整特性化的ES细胞株: 36株
- 完整特性化的EG细胞株: 1株
- 美国国立保健院登记的人类ES细胞株: 1株(Miz-hES1)
- 复制的人类ES细胞株: 1株 + 11株



U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

National Institutes of Health

Health Grants News Science Institutes About NIH



Home Page

2004年6月15日

## NIH Human Embryonic Stem Cell Registry

美国国立保健院  
人类胚芽干细胞登记现状

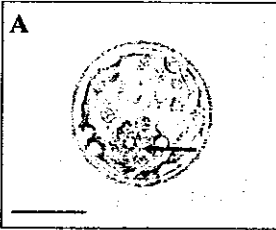
• BresaGen, Inc., Athens, 乔治亚州	4(2)
• CyThera, Inc., San Diego, 加利福尼亚州	9
• ES Cell International, Melbourne, 澳大利亚	6(5)
• Geron Corporation, Menlo Park, 加利福尼亚州	7
• Göteborg University, Göteborg, 瑞典	19
• Karolinska Institute, Stockholm, 瑞典	6
• Maria Infertility Hospital Medical, Seoul, 韩国	3
• MizMedi Hospital - 首尔大学, Seoul, 韩国	1(1)
• National Centre for Biological Sciences, Bangalore, 印度	3
• pochon CHA university, Seoul, 韩国	2
• Reliance Life Sciences, Mumbai, 印度	7
• Technion University, Haifa, 以色列	4(2)
• University of California, San Francisco, 加利福尼亚州	2(1)
• Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, 威斯康星州	5(3)

□ □ □ □ □ □

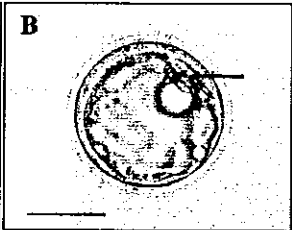
### 根据不同胚泡质量导出的人类胚芽干细胞

---

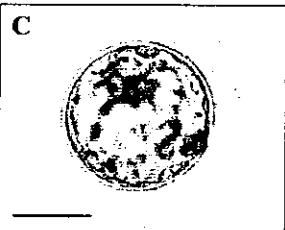
**A**



**B**



**C**



箭头表示ICM区域。 Scale bar, 100 μm.

胚泡质量是最重要因素之一：着床和妊娠

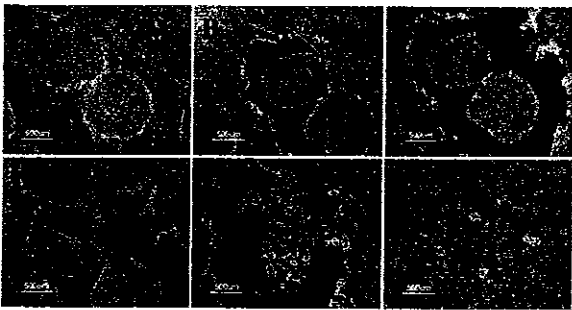
- (A)** 优良的胚泡具有大而明显的ICM，因此采用免疫外科学方法。
- (B)** 具有小ICM的，扩张的胚泡采用部分胚芽培养方法。
- (C)** 具有不明确ICM的胚泡采用完整胚芽培养方法。

© 2005 Nature Publishing Group

□ □ □ □ □ □

### 机械式移植维持hESC (I)

---



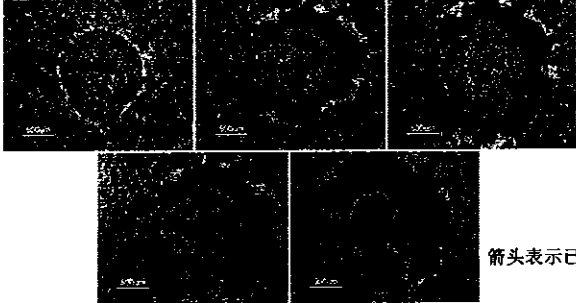
Scale bar, 500 μm.

- A)** 第6天，STP滋养层出现的未分化群
- B)** 利用解剖吸液管，从hESC脱落的滋养层群分离
- C)** 滋养层与hESC群之间完全分离
- D)** 使用吸液管分为小块
- E)** 完全切断的小块
- F)** 利用移植吸液管转移到新的培养盘

© 2005 Nature Publishing Group

□ □ □ □ □ □ □ □

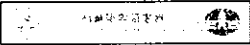
### 机械式移植维持hESC (II)



箭头表示已变化的hESC细胞

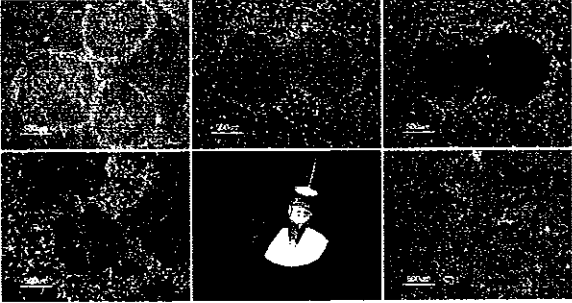
#### 从已变化的细胞机械式分离及移植未变化的hESC

- hESC群内形成的分化细胞 (第6天, 箭头所指的部分)
- 利用吸液管, 从hESC群脱离的滋养层
- 滋养层与hESC群之间的完全分离
- 利用吸液管从已分化的细胞分离未分化的细胞  
未分化的细胞分离成小块。
- 分化细胞不变, 所有未分化的细胞分为小块




□ □ □ □ □ □ □ □

### 通过酶移植大量细胞

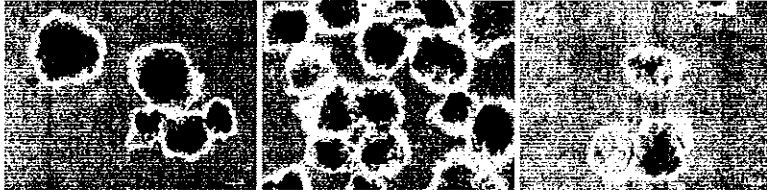


- 用胶原质分解因素处理的未分化hESC群
- 酶处理30分钟后, 细胞从边缘附近开始脱落,  
这时除去胶原质分解酶, 添加新的培养基
- 使用微型吸液管, 小心地从盘中拿起群
- 从盘中分离大部分群
- 用圆锥形管提取分离的hESC群, 为了使其沉淀到底部, 并形成小块, 用吸液管转移多次
- 将大小不一的小块移至新的培养盘



人类Feeder Support发展过程的3种形态 (II)  
未分化 hESC

3) 形成胚子形状



hES9 P15 -第5天EB(X100)  
AF Cells

hES9 P15 -第5天 EB(X100)  
Foreskin

hES9 P15 -第5天 EB(X100)  
CVS

4) 染色体组型

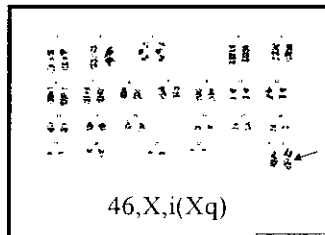
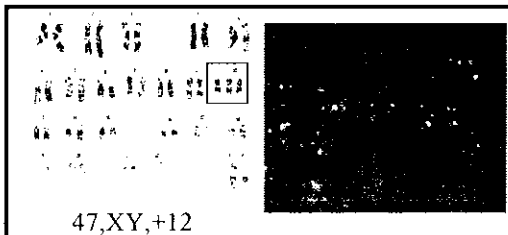
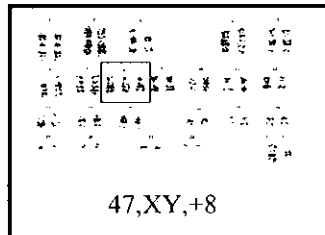
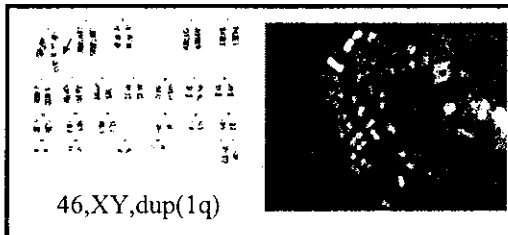


hES9 P11 AF Cells

hES9 P11 Foreskin

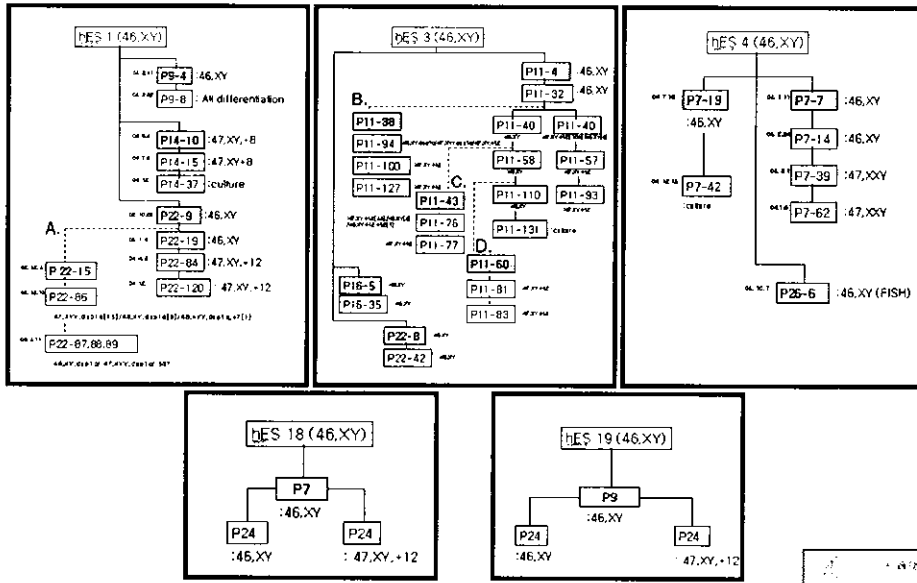
hES9 P11 CVS

SNUhES细胞株内出现非正常染色体

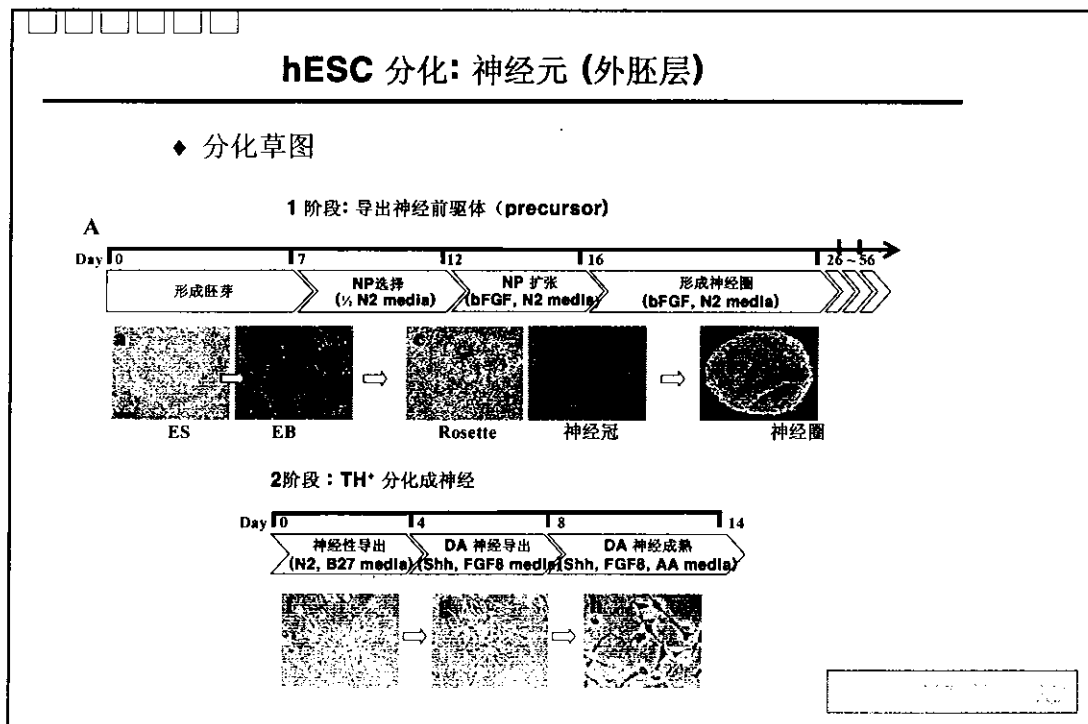
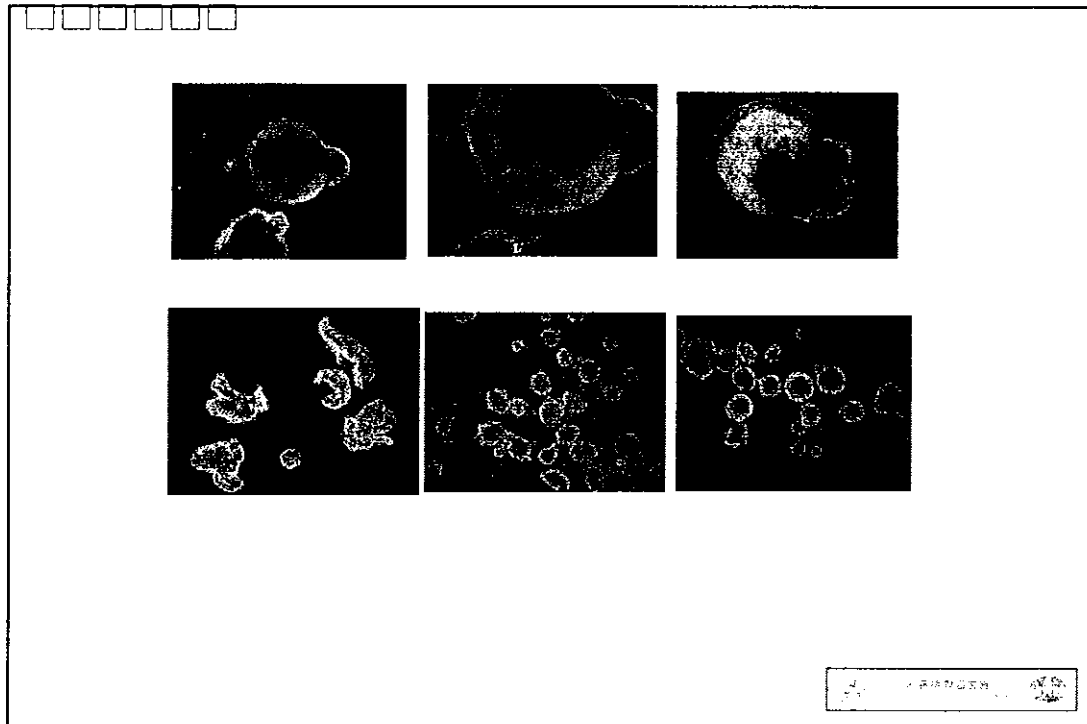




## SNUhES细胞株的染色体组型系



## 人类胚芽干细胞的分化

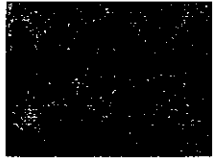


□□□□□□

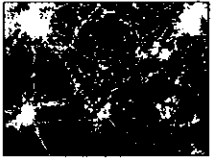
## hESCs 分化：神经元(外胚层)

---

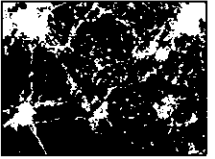
◆ TH 养成神经元的免疫细胞化学作用



TH 养成细胞

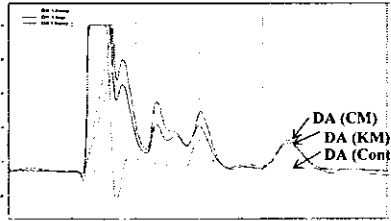


$\beta$  III 微管蛋白 (tu  
bulin) 养成神经元

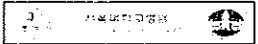


TH 养成神经元

◆ 向培养基分泌多巴胺 (dopamine) 的HPLC分析



DA (CM)  
DA (KM)  
DA (Control)



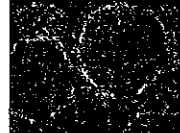
□□□□□□

## hESC 分化：心脏肌肉细胞(中胚层)

---


◆ 分化草图

第7天




未分化的hESC

第30天




胚芽

第20天

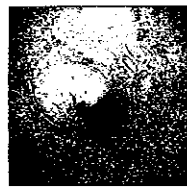
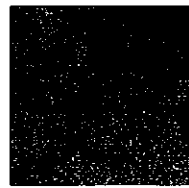



分化的细胞




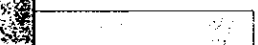
Beating Cluster

◆ hES细胞的Beating Cluster形体分析

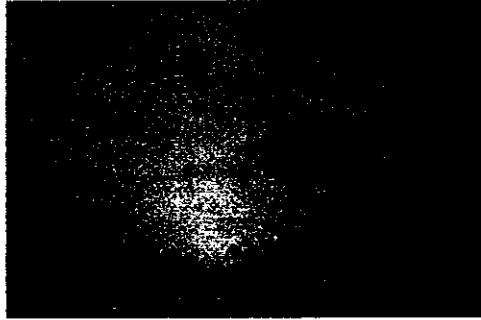









# BMP2-导出分化



500µm

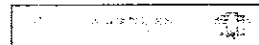
## ▶ 培养状态

- 悬浮30天
- 附着20天
- 0.6ng/ml BMP2

## ▶ Beating

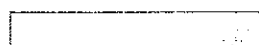
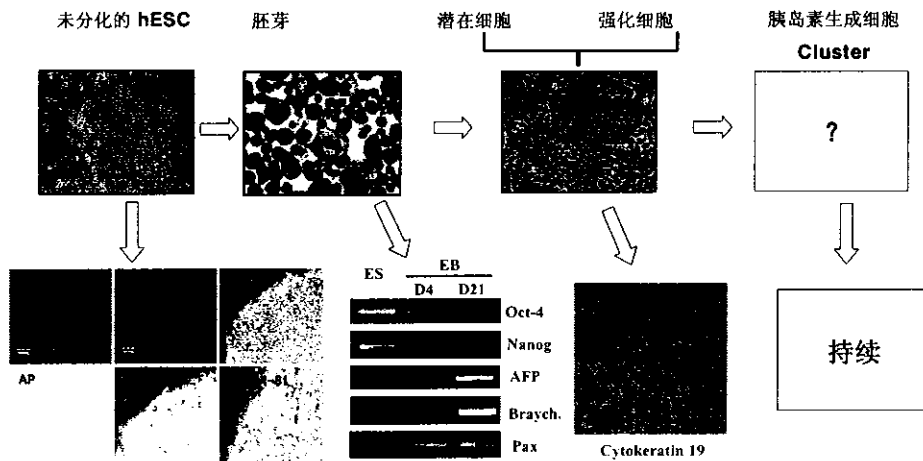
- 对温度变化敏感
- 到目前为止持续Beating
- 25 / 分钟

从hES 细胞导出的心脏肌肉细胞显现出心脏相关的特征，生成Beating Cluster。  
可以认为FGF2和BMP2从hES细胞促进心脏细胞分化。



# hESCs 分化：胰岛素生成细胞(内胚层)

## ◆ 分化草图



### 人类胚芽干细胞的细胞阶段操作

### TAT-Pdx1抄写

### 引进TAT-PDX1蛋白质特性

### 出现胰岛素蛋白质

**Kwon YD, Moon SY : 人类胚芽干细胞的细胞更正  
引进TAT-PDX1蛋白质特性. Molecular therapy 12;28-32. 2005年7月**

### 环太平洋地区主要的干细胞研究中心

**CHINA**  
Beijing University  
Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences (Beijing)  
National Center for Stem Cell Research (Beijing)  
Changsha Medical College  
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences (Guangzhou)  
Shanghai Second Medical University  
Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College (Tianjin)

**YOUTH KOREA**  
Seoul National University  
Korea Stem Cell Research Center (Seoul)

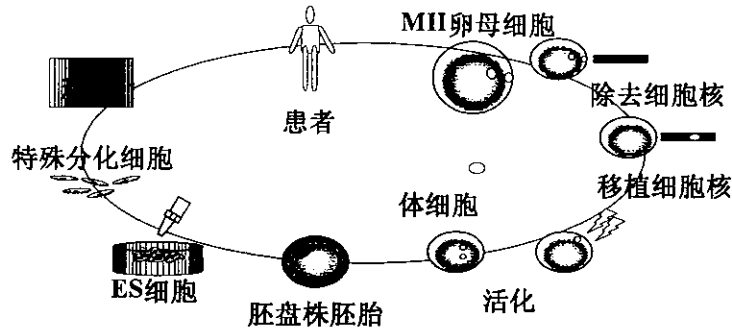
**CALIFORNIA**  
Burnham Institute (La Jolla)  
Geron Corp. (Menlo Park)  
Institute for Regenerative Medicine (location to be announced)  
Reeve-Irvine Research Center (Irvine)  
Salk Institute for Biological Studies (La Jolla)  
Stanford University (Palo Alto)  
Univ. of California, San Diego  
Univ. of California, San Francisco

**JAPAN**  
RIKEN Center for Developmental Biology (Kobe)  
Kyoto University  
University of Tokyo

**TAIWAN**  
Biomedical Engineering Center of the Industrial Technology Research Institute (Hsinchu)  
Academia Sinica (Taipei)

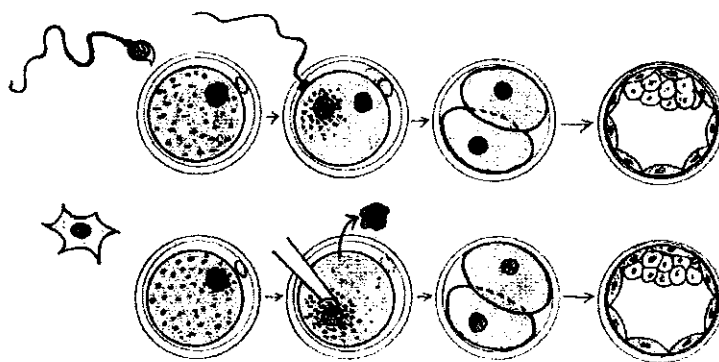
**SINGAPORE**  
ES Cell International  
Center for Molecular Medicine  
Genome Institute of Singapore  
National University of Singapore

## 治疗目的复制（体细胞核移植）

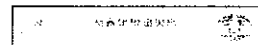


因伦理、实用性等原因，很多地区都禁止SCNT。这是因为SCNT技术可以促进繁殖目的的人类复制。SCNT技术利用患者本人的细胞，因此对于移植的细胞组织，患者的免疫系统不产生排斥反应。

## 体外受精/复制胚胎



替换基因 → 生成合适的hESCs




**“潜在可能性”**

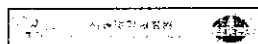
复制牛(1999)&猪(2002)  
Hwang et al.

→


确立SCNT-hES-1  
(2003)

Miz-hES1细胞 (2001)  
Yoon et al.



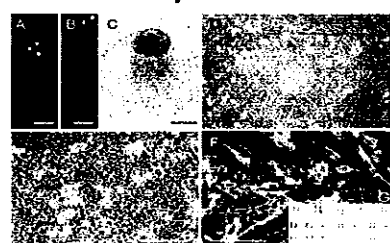


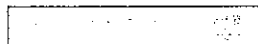
**由体细胞核移植确立  
复制人体胚芽干细胞株**



从胚胎复制中导出的  
多功能人类胚芽干细胞株的依据

Woo Suk Hwang,<sup>1,2\*</sup> Young June Ryu,<sup>1</sup> Jong Hyuk Park,<sup>2</sup>  
Eui Soon Park,<sup>1</sup> Eu Gene Lee,<sup>1</sup> Ja Min Koo,<sup>4</sup> Hyun Yong Jeon,<sup>1</sup>  
Byeong Chan Lee,<sup>1</sup> Sung Koun Kang,<sup>1</sup> Sun Jong Kim,<sup>3</sup> Curie Ahn,<sup>5</sup>  
Jung Hye Hwang,<sup>6</sup> Ky Young Park,<sup>7</sup> Jose B. Cibelli,<sup>8</sup>  
Shin Yong Moon<sup>2\*</sup>





2004

2005

**Scienceexpress** Report

• 从人体SCNT胚胎中导出的适合患者特性的干细胞

Woo Suk Hwang,<sup>1,2\*</sup> Sung Il Roh,<sup>1</sup> Hyeonng Chun Lee,<sup>1</sup> Sung Keun Kang,<sup>1</sup> Dae Kee Kwon,<sup>1</sup> Sue Kim,<sup>1</sup> Sun Jong Kim,<sup>3</sup> Sun Woo Park,<sup>4</sup> Hee Sun Kwon,<sup>1</sup> Chang Kyu Lee,<sup>2</sup> Jung Bok Lee,<sup>2</sup> Jin Mee Kim,<sup>3</sup> Curie Ahn,<sup>4</sup> Sun Ha Paek,<sup>4</sup> Sang Sik Chang,<sup>4</sup> Jung Jin Koo,<sup>4</sup> Hyun Soo Yoon,<sup>4</sup> Jung Hye Hwang,<sup>4</sup> Youn Young Hwang,<sup>4</sup> Ye Soo Park,<sup>4</sup> Sun Kyung Oh,<sup>4</sup> Hee Sun Kim,<sup>4</sup> Jong Hyuk Park,<sup>4</sup> Shin Yong Moon,<sup>4</sup> Gerald Schatten<sup>5</sup>

**根据SCRC指南  
进行共同研究**

进行所有试验之前得到了人类对象研究  
及伦理委员会相关的IRB的许可

卵母细胞次数  
汉阳大学

IRB 许可

预防人类复制的管理  
干细胞研究中心（韩国）

SCNT → 复制的hES细胞  
首尔大学



## 导出患者-特异性NT- hES细胞株

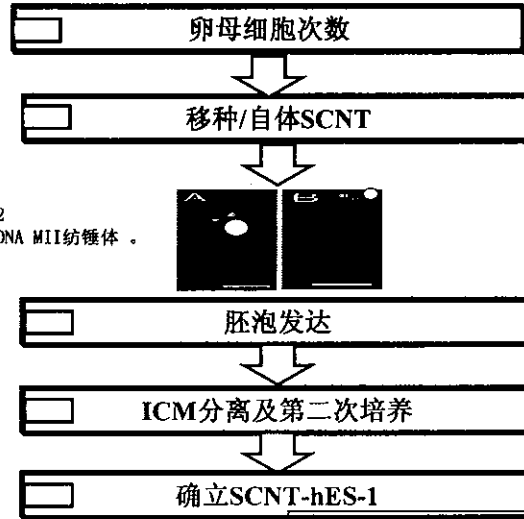
为了此次研究，18名女性捐赠185个卵母细胞，其中125个细胞由30岁以下的女性捐赠。

捐赠者的纤维原细胞移植到消除核的卵母细胞中。

为了直接确认是否消除了卵母细胞的DNA，使用Hoechst 33342 荧光DNA染色药，用图像显示了从所有卵母细胞中挤压出来的DNA MII纺锤体。

进行2小时重新编排，  
将25%左右的胚芽培养到胚泡阶段。

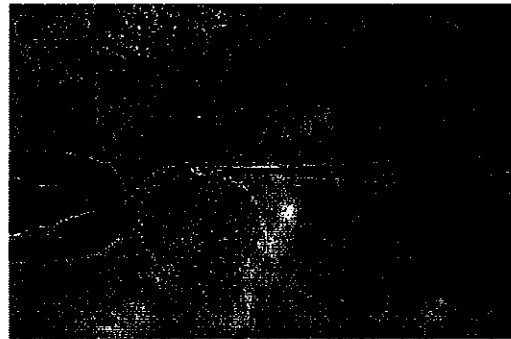
利用2-56岁男女SCI、JD和CHG患者体细胞，导出11个SCNT-ES细胞株。



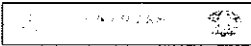
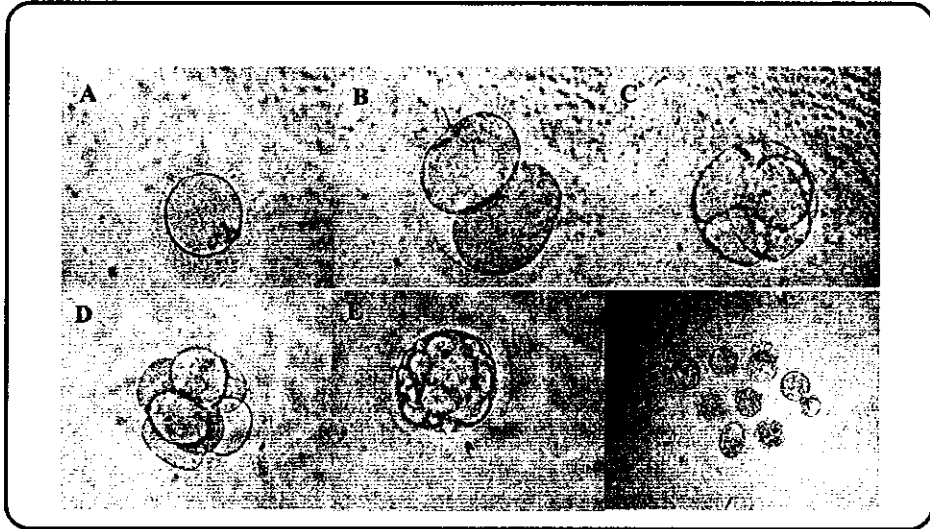
## 导出复制的人类胚芽干细胞

压缩MII卵母细胞，减少对卵母细胞的损伤，同时使DNA方垂体从透明带小孔挤压出来。

消除核，确认是否消除卵母细胞的DNA，形成NT、融合、活化。



复制的人类胚芽干细胞

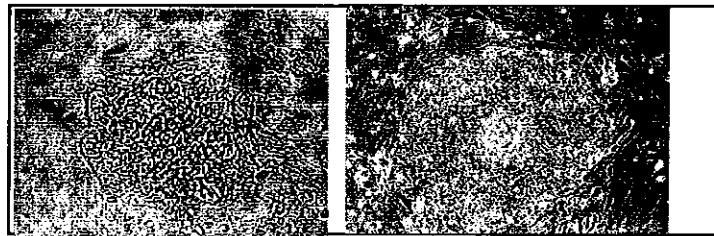


确立复制的人类胚芽干细胞



复制的人类胚胎

分离的 ICM



ICM诱导

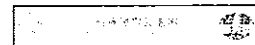
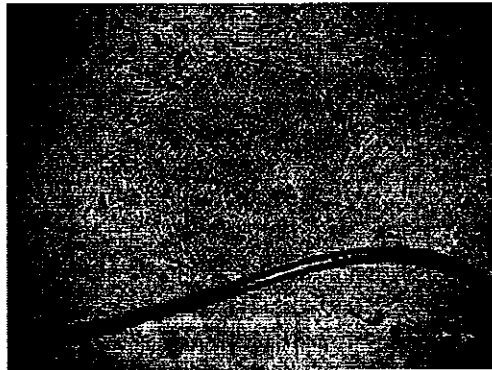
SCNT-hES-1(第140次 passage)



## 用于subculture的人类胚芽干细胞草图

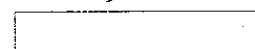
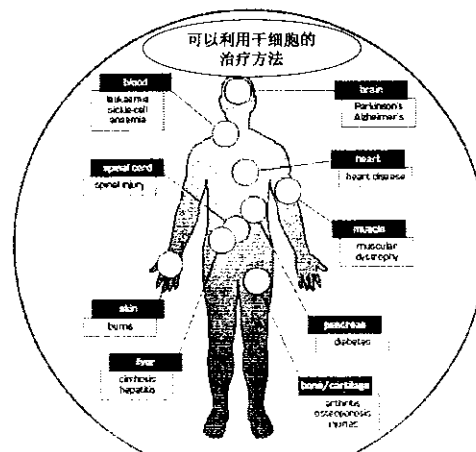
每7-9天进行 subculture

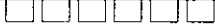
- Trypsin (0.05%) 或 collagenase IV (200 units/ml或1 mg/ml) :  
可以导出非正常核型(trisomy 12、17或18)
- 机械分裂: 玻璃吸液管(本研究室)或勾针



## 进行细胞治疗的 胚芽干细胞

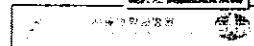
- 确立胚芽干细胞
- 分化多功能干细胞
- 分化的细胞动态及分离
- 分化细胞移植
- 移植细胞功能评价





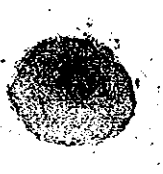
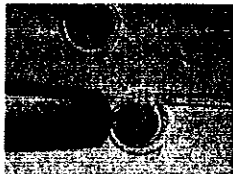
## 细胞层面治疗工作中的安全性问题

1. 可以导出所有细胞吗？可以符合每个人吗？
2. 移植的多功能干细胞是否形成肿瘤，若不形成肿瘤，是否进行不适当的分化？
3. 是否存在胚芽导出多功能干细胞或含小血清培养干细胞感染者？



## 结论

- 本研究中从每个患者中提取的干细胞提供了病态细胞，通过它便于理解疾病发展方向，促进药物开发。
- 在临床上使用之前应明确每个患者的**NT-hESC**生物学特性，确立可靠的分化过程。而且细胞不能存在感染未分化细胞的因子或潜在的病原菌。





서울대학교병원  
Seoul National University Hospital



Stem Cell Research Lab  
2002.10.15







本研究由科学技术部提供支援，  
利用**21世纪边缘研究开发事业干细胞研究后援资金(SC1020)**完成。

