

# 干细胞技术进展及其在海洋动物研究中的应用展望

## A review on stem cell technology and prospects of its application to aquatic animal research

金 刚<sup>1,2</sup>, 蔡国平<sup>1</sup>, 洪水根<sup>1,3</sup>

(1. 清华大学 深圳研究生院, 广东 深圳 518055; 2. 深圳职业技术学院, 广东 深圳 518055; 3. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)12-0088-04

干细胞(Stem cell)是具有多向分化潜能、自我更新能力的细胞,是处于细胞系起源顶端的最原始的、在体内能够分化产生某种特定组织类型的细胞<sup>[1]</sup>。在干细胞和其终末分化的子代细胞之间存在着被称为“定向祖细胞”的中间祖细胞群,具有有限扩增能力和限制性分化潜能<sup>[2]</sup>。按照发生学来源,干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞,胚胎干细胞具有发育的全能性,理论上可以诱导分化为机体所有类型的细胞,在体外可以大量扩增、筛选、冻存和复苏而不会丧失原有特性;成体干细胞是指存在于一种已经分化组织中的未分化细胞,能够自我更新和特化形成组织细胞,甚至能够表现出很强的跨组织分化潜能。由于干细胞在医学和农业上有巨大的应用潜力,在1999年被《Science》杂志列为世界十大科技进展之首,2000年再度入选世界十大科技进展。至今为止,干细胞的研究主要在哺乳动物(包括人)开展;在水生动物中,对鱼类进行了较深入的胚胎干细胞研究<sup>[3]</sup>。作者主要介绍近年来干细胞研究进展,并展望干细胞技术在经济水生动物资源利用研究中的应用前景。

### 1 干细胞分离、培养和扩增方法

基于干细胞的物理特性(如细胞体积、密度、黏附特性等)和表面标志(受体分子)使之与其它组织细胞分开。对于单个胚胎,先采用显微切割或胰蛋白酶消化,使干细胞暴露于显微镜下,再用细玻璃管挑出<sup>[4,5]</sup>。

干细胞的培养与通常的动物细胞培养类似,但培养条件更为苛刻。人胚胎干细胞(hES)需要在滋养层细胞上生长,还需要稳定的培养温度(37℃)和湿度,以及5% CO<sub>2</sub>,一般还在培养皿上铺一层有利于细胞黏附的基质(如明胶)。在干细胞培养中,需要添加适量的干细胞因子、白细胞介素(如IL-3, IL-6)等,为了使干细胞较好生长和防止细菌污染,胎牛血清、谷氨酰胺、β-巯基乙醇和抗生素是常用添加物。

在哺乳动物胚胎干细胞培养建系初期还可加入人重组白蛋白抑制因子(rhLIF)<sup>[6]</sup>。胚胎干细胞一般在DMEM为基础培养基。

在各类干细胞中,体外培养和规模化扩增研究较多,技术较成熟的是造血干细胞<sup>[7,8]</sup>。这主要归因于造血干细胞具有巨大的临床需求。目前已经致力于研究大规模培养造血干细胞的生物反应器系统设计<sup>[9]</sup>。研究表明,干细胞生长因子、白细胞介素(IL-3和IL-6)、粒细胞集落刺激因子和红细胞生成素5种细胞因子联合对脐血CD34<sup>+</sup>细胞(主要为造血干/祖细胞)扩增效果最好,其增殖高峰在第3~4周,单个核细胞数和粒红巨噬巨核细胞集落形成单位(CFU-GEMM)增殖倍数最高分别达3 268倍±1 024倍和85倍±31倍<sup>[10]</sup>。

### 2 干细胞鉴定

除了细胞形态和生长特性外,还需要用一些生物化学方法来鉴定干细胞。目前普遍采用的方法是依靠干细胞的表面标志或称分化抗原(即覆盖在细胞表面的特殊的蛋白质受体,能选择性地结合或黏附其它信号分子)来区分和鉴定各种干细胞。利用单克隆抗体的特异性和多样性,应用不同抗体的合理组合,与干细胞的多个表面标志进行结合反应,即可证明。此外,可以通过检测特异性的基因和转录因子来鉴定干细胞。不同干细胞的培养特征、标记分子和分化能力见表1。

收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-10-04

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(04011209)

作者简介: 金刚(1965-),男,湖北当阳人,研究员,博士,目前在清华大学深圳研究生院做博士后研究,研究方向: 海洋生物技术, E-mail: jingang@oa.szpt.net

表 1 不同干细胞的特点及鉴定方法

干细胞	形态和生长特性	标记分子	分化能力
胚胎干细胞	胞体体积小、核大、核仁 1 个或几个;克隆状生长,细胞紧密聚集,形似鸟巢,细胞界限不清	SSEA-1, SSEA-3 SSEA-4, TRA-1-60 TRA-1-81	体外分化为各种细胞、可形成拟胚体,体内分化实验可生成组织瘤,还可进行嵌合体形成实验和核移植实验
造血干细胞	高度的增殖能力	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> , Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (Lin <sup>-</sup> ), CD133 <sup>+</sup> , KDR <sup>+</sup>	具有向髓系和淋巴系多向分化的潜能
神经干细胞	大多呈梭形,两端有较长的神经突起;原代培养的细胞在 24 h 内自动聚集成团	巢蛋白、波形蛋白、 RNA 结合蛋白 Musashi, RC1 抗原	可分化为神经、肌肉、血液和肝细胞
骨髓间充质干细胞	细胞体积小、呈梭形、核大	表达 SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 等	可分化为多种细胞:骨、软骨、脂肪、肌肉、神经、肝和内皮等
肌肉干细胞	多呈纺锤形,细胞之间有细丝相连成网	检测结蛋白、磷酸肌醇激酶 CK-MM 亚型	可向造血系统分化
原始生殖细胞	体外培养 7 d,出现鸟巢状或其它形状集落	小鼠胚胎 7.5~8.5 d 以后, 检测 TNAP, SSEA1 和 OCT-4 (一种转录因子)	具有参与嵌合体组织(包括生殖系统)的能力

注:表 1 中生长特性是指在体外培养中;SSEA:胚胎阶段特异性细胞表面抗原;CD:分化群

### 3 干细胞定向分化

在一定条件下,如添加造血生长因子,体外培养的胚胎干细胞能够分化发育成神经干细胞<sup>[11]</sup>和造血干/祖细胞<sup>[12]</sup>。将发育 3~35 d 的小鼠胚胎干细胞置于含有集落刺激因子和血管内皮细胞生长因子的培养基中,则可以形成胚胎细胞样集落,细胞表面表达血液细胞的抗原标志分子,表现明显的造血潜能<sup>[13,14]</sup>。最近已从鼠胚胎干细胞获得淋巴细胞<sup>[15,16]</sup>。在定向分化过程中,可以对干细胞进行遗传操作,也可以对分化途径中的细胞进行微环境的控制(图 1)。



图 1 胚胎干细胞分化为 B, T 细胞示意图

OP9:骨髓基质细胞系;OP9-DL1:通过转基因,能够表达 Notch 配体—Delta like 1(DL1) 蛋白分子,DL1 在 T 细胞发育和成熟过程中具有关键作用

### 4 水生动物干细胞研究现状

已经在鱼类、海绵、扁形动物、海鞘、水螅等许多水生动物研究了干细胞的分离、体外培养、体内分布、迁移等基础生物学。近来已经开始研究青鳉胚胎干细胞系保持全能性(即阻止自发分化)的分子机制<sup>[17]</sup>。

鱼类胚胎干细胞的培养研究已经从小型模式种类(如青鳉和斑马鱼)扩大到养殖种类。Chen 等<sup>[18]</sup>报道,从海水养殖鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)囊胚期受精卵获得干细胞并建成一个多能细胞系(LJES1),其基础培养基是 DMEM,另外添加胎牛血清、海水鱼血清、鲈鱼胚胎浸出物、微量元素硒、碱性成纤维细胞生长因子和白白血病抑制因子等。在培养中,这些胚胎干细胞样细胞较小,圆形或多角形,生长活跃且稳定,组织化学染色表明,碱性磷酸酶活性呈阳性。用全顺式维甲酸处理,LJES1 分化为多种细胞类型,包括神经元样细胞、肌肉细胞等。染色体分析揭示 LJES1 细胞具有正常的二倍体核型。到他们发表论文时,LJES1 细胞培养时间已经超过 150 d,传 40 多代。冻存后,其存活率很高,GFP 报告基因被转入并成功表达。该研究显示,通过培养的胚胎干细胞进行遗传操作进而培育鱼类新品种具有广阔前景。硬骨鱼类成体视网膜对研究脊椎动物中枢神经系统持续的和损伤诱导的神经发生是一个重要的模型。大量证据表明那些为视网膜边缘和视干细胞提供神

经元的祖细胞就来自多能干细胞,而且在视网膜中与生长关联的神经发生的行为部分是由生长激素/胰岛素样生长因子-I轴调节的<sup>[19]</sup>。

海洋扁形动物干细胞(neoblasts)是多能的(很可能是全能的)未分化细胞,在成体生活期间具有增殖能力,所有的体细胞和生殖细胞都来自干细胞。用胸腺嘧啶脱氧核苷类似物——5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)标记 *Macrostomum* sp. S-期细胞,发现 S-期细胞就是 neoblasts,分布于身体两侧的带状区域,而身体中轴线附近和眼前部区域没有标记细胞。这一结果与用抗磷酸化组蛋白 H3 抗体显示有丝分裂细胞的分布是一致的。BrdU 标记还表明上皮细胞的更新非常频繁<sup>[20]</sup>。

在海绵动物干细胞的研究中,使用了来自 *Suberites domuncula* 切碎的约 1 mm<sup>3</sup> 小块组织(primmorphs),培养在有或形态发生因子无硅酸盐和三价铁离子的培养基中(RPMI 1640/seawater)。在 primmorphs 中发现 2 个编码基因,他们编码的蛋白质出现于高等后生动物的干细胞。一个是 *noggin* 基因,在两栖类(Spemann)组织者(organizer)出现;另一个基因编码间质干细胞样蛋白。在有硅酸盐和三价铁离子的培养基中,primmorphs 中 *noggin* 的表达显著上调,而后者表达被抑制<sup>[21]</sup>。

## 5 干细胞技术在水生动物研究中的应用前景——以中国鲎为例

中国鲎(*Tachyplesus tridentatus*)隶属节肢动物门、肢口纲、剑尾目,在我国长江口以南沿岸海域(浙江至广西)均有分布<sup>[18]</sup>,为我国传统的海产食品和药源生物。从鲎血细胞制取的鲎试剂(与内毒素起凝聚作用的酶系统,即凝固蛋白原、凝固酶原、B因子和C因子)检测革兰氏阴性菌内毒素具有高灵敏度,且简便、快速,目前已广泛用于临床医学、制药工业、药品检验、环境监测、食品卫生等领域。世界上许多国家都建立了专门生产鲎试剂的工厂和公司。在生产过程中必须从活体鲎取血,常常导致鲎死亡。现已从鲎的天然免疫系统(包括血浆和血细胞)发现 50 多种活性蛋白和多肽<sup>[22]</sup>,其中多种免疫物质具有治疗人类肿瘤的可能,可见鲎血具有极大的研究和开发价值。要想获取大量的鲎血,而不对鲎种群构成危害,是非常困难的。造血干细胞(Hematopoietic stem cell)是具有高度自我更新能力和多向分化潜能的造血前体细胞。哺乳动物造血干细胞来自骨髓、外周血和脐带血,造血系统在体内相对独立,易于分离和操作。造血干细胞是不均一的细胞群体,缺乏直接的形态学

鉴别特征。利用细胞表面的分化抗原(如 CD34)及免疫磁珠、流式细胞术等技术可分离纯化造血干/祖细胞,并可进行体外扩增。

对成体鲎(雄性,最大壳宽在 17~22 cm)黄色结缔组织切片的电镜观察表明,血细胞发生于与生殖细胞发生相邻部位的结缔组织,其间以基膜为界;血细胞在由基膜形成的网状结构中发育,可分 3 个阶段:原始细胞(prohaemocyte)、浆细胞(plasmacyte)和颗粒细胞(granulocyte),原始细胞长径平均 10.5 μm,短径 3.5 μm,而成熟的血细胞大小在 10~15 μm<sup>[23]</sup>。这里的原始细胞可能就是造血祖细胞,它的前体细胞可能是或者更接近造血干细胞。由于成体鲎血细胞发生位点已经确定,而且造血祖细胞在形态上有别于成熟的血细胞,分离成体造血干祖细胞是可行的。十分有趣的是,印度科学家成功地进行了培养鲎(*Tachyplesus gigas*)鳃组织造血的实验,用添加 10% 鲎血清的 L-15 培养基在 28 °C 摇床培养鲎鳃组织,血细胞不断产生出来,长达 6~8 周<sup>[24]</sup>。作者用 DMEM 为基础培养基,添加 10%~20% 的小牛血清,进行中国鲎鳃组织培养,实验第 3 天观察到有活动能力的血细胞(未发表资料)。这些工作表明,鲎鳃具有造血功能,亦即鲎鳃组织中有造血干/祖细胞。作者下一步打算分离出这些细胞。

干细胞技术能够渗透进海洋动物研究的许多方面。将胚胎干细胞技术与基因打靶技术结合起来,可对基因组进行定点操作<sup>[25]</sup>,从而获得遗传改良的水产养殖新品种。若把海洋药用动物的干细胞大规模培养后,定向分化为可分泌活性物质的功能细胞,则可解决目前困扰世界海洋生物制药产业的瓶颈——海洋药源生物严重不足的问题。若把高级食用水产动物的干细胞扩增后分化为具有特殊风味的细胞,则可作为食品添加剂。最近,Thomas 等<sup>[15]</sup>把从胚胎干细胞培育出来的未成熟的免疫细胞移植到免疫系统缺乏的老鼠身上,能帮助老鼠抵抗温和的滤过性毒菌引起的感染。日本学者从一种三倍体鲫(*Gimnocypris carassius auratus langsdorffii*)肾脏分离出造血干细胞进行培养和扩增,并将之通过尾静脉注射入该鱼的四倍体杂种个体,经 DNA 分析发现,4~12 周后在受体鱼血液中移植的造血干细胞分化为成熟的红细胞<sup>[26]</sup>。这些工作对探索新的水产动物病害防治途径具有很大的启发意义。可以预计,干细胞理论和技术将极大地推动水生生物学诸多领域的发展,具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

[1] 裴雪涛. 干细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社,

- 2003, 1-565.
- [2] Slack J M W. Stem cells in epithelial tissue [J]. **Science**, 2000, 287: 1 431-1 433.
- [3] Hong Y H, Gui J F, Chen S L, *et al.* Embryonic stem cells in fish [J]. **Acta Zoologica Sinica**, 2003, **49** (3): 281-294.
- [4] 谢松涛, 朱德生, 杨贵忠, 等. 人胚胎原生殖细胞中胚胎干细胞的分离培养[J]. 第四军医大学学报, 2003, **24**(10): 905-907.
- [5] 安静, 杜立新. 鸡胚胎干细胞的分离、培养和鉴定[J]. 动物学报, 2003, **49**(5): 698-703.
- [6] Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. **Science**, 1998, 282: 1 145-1 147.
- [7] Gray L G, Darlene K D, John L, *et al.* Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells [J]. **Experimental Hematology**, 2000, 28: 1 297-1 305.
- [8] Kim B-S. Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor [J]. **Biotechnology Letters**, 1998, **20**(6): 595-601.
- [9] Cabrita G J M, Ferreira B S, da Silva C L, *et al.* Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor [J]. **Trends in Biotechnology**, 2003, **21**(5): 233-240.
- [10] 钱文斌, 林茂芳, 黄河, 等. 脐血 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞体外扩增的研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 1999, **28**(4): 145-147.
- [11] 陶靖, 葛坚, 黄冰, 等. 体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为神经干细胞的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, **19**(3): 289-292.
- [12] Lu S J, Quan C S, Li F, *et al.* Hematopoietic progenitor cells derived from embryonic stem cells: analysis of gene expression [J]. **Stem Cells**, 2002, 20: 428-437.
- [13] 刘革修, 张涓. 胚胎干细胞向造血细胞分化研究[J]. 生命科学, 2003, **15**(1): 21-25.
- [14] Kyba M, Daley G Q. Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny [J]. **Experimental Hematology**, 2003, 31: 994-1 006.
- [15] Thomas M S, René F de P, Matthew A G, *et al.* Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro* [J]. **Nature Immunology**, 2004, **5** (4): 410-417.
- [16] Rothenberg E V. From totipotency to T in a dish [J]. **Nature Immunology**, 2004, **5**(4): 359-360.
- [17] Hong Y-H, Winkler C, Liu T-M, *et al.* Activation of the mouse Oct. 4 promoter in medaka embryonic stem cells and its use for ablation of spontaneous differentiation [J]. **Mechanisms of Development**, 2004, 121: 933-943.
- [18] Chen S-L, Sha Z-X, Ye H-Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos [J]. **Aquaculture**, 2003, 218: 141-151.
- [19] Otteson D C, Hitchcock P F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration [J]. **Vision Research**, 2003, 43: 927-936.
- [20] Ladurner P, Rieger R, Baguna J. Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: A bromodeoxyuridine analysis [J]. **Developmental Biology**, 2000, 226: 231-241.
- [21] Muller W E G, Korzhnev M, Pennek G, *et al.* Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*) [J]. **Biomolecular Engineering**, 2003, 20: 369-379.
- [22] Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab [J]. **Current Opinion in Immunology**, 2002, 14: 87-95.
- [23] Hong S-G, Huang Q, Ni Z-M. Ultrastructural observations on hematopoiesis in adult horseshoe crab (*Tachypleurus tridentatus*) [J]. **Acta Zoologica Sinica**, 2000, **46**(1): 1-7.
- [24] Joshi B, Chatterji A, Bhone R. Long term *in vitro* generation of amoebocytes from the India horseshoe crab *Tachypleurus gigas* (Muller) [J]. **In Vitro Cell Dev Biol - Animal**, 2002, 38: 255-257.
- [25] 陈松林. 鱼类胚胎干细胞研究进展[J]. 中国水产科学, 2001, **7**(4): 95-98.
- [26] Morimoto T, Asakura N, Sekiya M, *et al.* Cell culture of clonal gibel carp hematopoietic cells: differentiation of cultured cells into erythrocytes *in vivo* [J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2004, 28: 863-869.

(本文编辑: 刘珊珊)