DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.001
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0001-03

专家论坛

干细胞基础与应用研究的一些进展

The progress in the Basis and Application of Stem Cells

周德山,蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

在正常人体组织中,每秒约有600万新生的红细胞替代相同数量死亡的红细胞;在胎儿和幼年期等成长阶段,皮肤要扩展,而且,一生中也需要不断的更新(约2~4周);肠粘膜上皮每周更新一次;在特殊情况下(如损伤),骨骼肌、肝脏等也可以再生得到补充,所以,机体需要一群具有保持分裂、分化能力的细胞,称为干细胞(Stem cell)。所谓干细胞是一类未成熟、未分化的细胞群,具有再生各种组织细胞,甚至器官的潜在功能,医学界称之为"万用细胞"。干细胞具有对称性分裂和非对称性分裂两种分裂方式,后者使干细胞得以在组织内终生保存,在这一过程中,各种细胞生长因子和细胞外基质等可能发挥重要调节作用[1]。

很早以前,人们已经注意到这种细胞的存在,但是一直未引起人们足够的重视。20世纪90年代后期,《Nature》杂志先后发表了利用成体动物细胞核克隆绵羊"多莉"和克隆鼠的报道,使发育生物学理论有了革命性的突破。特别是1998年Thomson[2]实验室和Shamblott[3]实验室分别成功地建立了人体胚胎干细胞系,在全球掀起了继人类基因组计划之后的又一次生物医学的革命,使干细胞的基础和应用研究受到了世界各国政府和研究者的高度重视,先后被美国《Science》杂志"1998、1999"两年连续评为年度重大科学进展,2001年被列入当今六大热门科技研究领域之一。因为干细胞具有非常广泛的应用前景,如在组织工程、药物筛选及临床细胞移植治疗糖尿病、血液病、神经退行性疾病等均具有极大的应用价值。现就胚胎干细胞和成体干细胞的研究概况简述如下。

1 胚胎干细胞

1.1 起源与特征

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES细胞)是从哺乳类动物的囊胚内细胞群(Inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)等分离的一群细胞。为正常的二倍体核型,端粒酶活性高,表达碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)和特异性免疫标志物:阶段特异性胚胎抗原(Stage-specific embryonic antigen, SSEA),TRA-1-60。具有全能性或多能性,在适当条件下ES细胞可被诱导分化为多种细胞或组织,包括神经元、造血干细胞和心肌细胞,是研究哺乳动物胚胎早期发生、细胞分化、基因调控等发育生物学基本问题的理想模型[4]。

作者简介:周德山(1958-),男,辽宁省昌图县人,博士,教授,主要从事胃肠道运动调控机制以及医学发育生物学中的干细胞基础与应用方面的研究。电话:(023)68752230

收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-11

1.2 细胞标志物及种属差异性

ES细胞表达早期胚胎细胞及胚胎肿瘤细胞(Embryonal carcinoma cells, EC细胞)的表面抗原、AKP及端粒酶活性。但是,在鼠和人的ES细胞之间存在种属差异性,如小鼠ICM和ES细胞均表达SSEA-1,但不表达SSEA-3和SSEA-4,而人和恒河猴ES细胞SSEA-1阴性,人PGCs分离的ES细胞SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60等均为阳性,利用这种差异和表面标志物可以验证胚胎干细胞。

1.3 应用前景

ES细胞系的建立对科学发展和人类健康具有其它干细胞系无法替代的作用:① 研究基因功能的有效手段,根据同源重组的原理,利用基因打靶技术进行基因组内指定基因的失活,研究人体某一基因的功能。② 揭示人及动物发育过程中的决定基因,有助于阐明发育早期的复杂事件。③ 可作为评价新药及化学产品毒性及效能的检测系统,能够极大地改进评价药品安全性的实验方法。例如,新的药物或治疗方法可在人的ES细胞系进行实验,既可缩短药品研制的时间,又可以更安全地进行动物和人体实验,这样可降低成本,缩短研究周期,具有重要的商业价值。④ 细胞移植的重要来源,即ES细胞有可能成为细胞替代疗法和组织器官移植的最佳来源。ES细胞作为个体发育的原始干细胞,理论上,它可无限地提供特异性细胞类型,用于置换疾病组织和放化疗损伤后的造血系统,为遗传病、肿瘤和衰老等疾病的治疗提供新的途径。目前已经发现ES细胞可以分化为包括神经干细胞、胰岛样结构等三胚层的多种组织细胞成分,但是,这种干细胞也存在与患者缺乏遗传上的相容性,移植物因免疫排斥而失败,相信通过基因工程技术敲除干细胞MHC制成通用型干细胞有望克服宿主抗移植物反应。

2 成体干细胞

2.1 概述

新近的研究表明,众多成体组织中(如骨髓、肌肉、胃肠道、皮肤、视网膜、外周及中枢神经系统等)均存在干细胞,称为成体干细胞。多数成体干细胞在出生前或出生后很短时间内分化为特定的组织细胞,仅一小部分仍然保留干细胞的特性存在于组织中。与胚胎干细胞相比,成体干细胞在移植医学中有诸多优势,如:从患者身上直接分离干细胞,进行体外大量增殖,诱使它们分化为所需细胞类别,再将它们移植回病人体内,这样不会因发生免疫排斥反应而失败,同时还可以避免使用来源于人体或胎儿的干细胞所带来伦理上的争端。另外,成体干细胞具有可塑性,能够分化为多种组织细胞成分,其中以造血干

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞和神经干细胞最引人注目[1,5]。下面以神经干细胞为例介绍其研究概况。

2.2 神经干细胞的生物学特征

20世纪60年代，Altman等用同位素标记胸腺嘧啶掺入技术，发现脑内新皮质、海马、嗅球等细胞含有同位素标记的胸腺嘧啶，提示上述区域存在能分裂的细胞。但是直到20世纪90年代初，Reynolds等[6]利用一种称为"Neurosphere法"的特殊培养条件，从胎鼠和成年鼠的纹状体中分离了神经祖细胞(Neural progenitor)，在表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)存在条件下，能够增殖形成细胞团，这些分离的细胞经诱导可分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞，表明该细胞团具有多向分化潜能。将该细胞团机械性分离成单细胞进行传代培养，亦可形成许多新的细胞团，这些传代细胞团同样能够分化为神经系统的上述三种主要细胞，说明该细胞具有自我复制能力[7]。神经干细胞的主要标志物为神经上皮巢蛋白(Nestin)，属于中间丝蛋白家族，主要存在于神经外胚层的多潜能细胞，随着神经上皮分化成熟逐渐消失，其功能目前尚未完全明确，可能具有结构和信息传递作用。

2.3 神经干细胞的分布

新近的研究表明人的胚胎期和成年期，脑内均有神经干细胞存在。早在20世纪90年代初期，Johnasson等[8]利用逆转录病毒标记法证明成年哺乳动物的脑室管膜含有大量的持续增殖的细胞，即神经干细胞。Weiss等成功地从成年哺乳动物脊髓内分离了一种神经干细胞，在EGF和bFGF共同存在下具有自我更新和增殖能力。意大利学者Anyelo等从人胚胎脑组织中分离培养的神经干细胞存活达2年以上。我室研究人员亦成功地从流产胚胎脑分离培养了神经干细胞。目前已经证明在啮齿类动物和人中枢神经系统的许多部位存在具有自我复制能力和多种分化潜能的神经干细胞[9]，包括大脑皮层、纹状体、海马、嗅球、室管膜、脑室下区、小脑和脊髓等处，但因其含量和局部微环境的限制，中枢神经系统损伤或变性时，自我修复能力甚微，所以寻找体外培养扩增自体或异体神经干细胞的最佳方法，可为临床治疗神经系统损伤和神经退行性疾病带来新的希望。

2.4 神经干细胞增殖分化的影响因素

生长因子对神经干细胞的增殖分化具有重要影响，促分裂增殖因子如EGF、bFGF和白血病抑制因子(LIF)，单独或联合添加于无血清培养基中均能促进神经干细胞的分裂增殖，并使其保持干细胞特性。环境也是影响神经干细胞分化的因素之一，例如将同一来源的神经干细胞移植到不同部位后，其分化结果不尽相同，实验显示皮层区的信号可以诱导神经干细胞分化为锥体细胞和星形胶质细胞，而纹状体区域的信号则诱导神经干细胞分化为多巴胺能神经元。我研究室李巍等用不同浓度的胎牛血清诱导培养人神经干细胞，发现血清的浓度越低，分化NF-200阳性神经元越多，而胎牛血清的浓度越高，GFAP阳性星形胶质细胞越多。Neuron杂志(2002年)刊登了两篇论著，将肠道分离的神经干细胞移植鸡神经嵴主要分化为神经元，而从外周神经分离的神经干细胞则主要分化为胶质细胞，提示除环境因素影响干细胞分化外，干细胞本身固有属性亦参与其定向分化调节。

2.5 神经干细胞的可塑性

新近研究显示NSC具有跨胚层分化能力，能够分化为数种非神经细胞[10]。Galli等将从人胚胎和成年小鼠分离的NSC与成肌细胞共同培养，发现NSC可分化为骨骼肌细胞；Bjornson等[5]用胚胎和成年的NSC以及体外克隆的NSC，移植给亚致死剂量照射的小鼠，结果证明NSC可转化为造血细胞；我室在体外培养的条件将神经干细胞诱导分化为类胰岛样细胞：beta-细胞和alpha细胞；尽管可塑性的机制非常复杂，可能与多种目前尚未清楚的基因产物同时作用有关，但是，NSC的可塑性使人们对NSC的研究寄予新的期望，可能作为多种细胞的来源用于临床部分疾病的治疗[1]。当然，其他组织的成体干细胞在适当条件下也能转化为神经干细胞，如成年动物造血干细胞可分化为脑的星形胶质细胞和少突胶质细胞。Kopen等的研究发现，将骨髓间充质细胞(MSC)注射至新生鼠的侧脑室后，在海马、嗅球、纹状体等部分均有MSC来源的神经胶质细胞和神经元，提示MSC具有一定的迁移能力和更广泛的应用前景[11]。

2.6 神经干细胞的应用

比较受注目的应用有两个方面：①研究神经系统的发育：因为神经系统的胚胎发育是瞬息万变的极其复杂的过程，在整体上连续观察这种演变过程几乎不可能，如将神经干细胞标记后移植到宿主脑内或眼前房，便于研究神经组织的成熟、分化及细胞间相互识别机制。②在移植医学中的应用：神经系统的创伤和退行性疾病，可望通过神经干细胞的移植寻找新的治疗途径。以往用胎脑移植治疗帕金森病确有一定效果，但每名患者至少需5~10个流产胚胎，无法满足众多患者的需求。神经干细胞分离培养的成功，可以大量提供神经元，既可解决胎脑移植数量不足的问题，又可避免医学伦理学的争端。例如Corti等将多巴胺合成过程中的限速酶(酪氨酸羟化酶)基因修饰的神经干细胞移植入纹状体，同时为保证在体内不致过高表达，将该基因置于一个四环素的基因负调控系统中，停用四环素，TH可恢复表达，疾病症状得到缓解[12]。我室尝试了将BDNF基因及NOV基因修饰的神经干细胞移植治疗大鼠脊髓全横断损伤，发现植入经基因修饰的神经干细胞能够存活并与宿主脊髓整合，大鼠肢体功能也有一定程度的恢复。尽管成体干细胞在细胞疗法中具有极大的利用价值，但是，仍有许多因素限制成体干细胞的应用，如成体干细胞含量极微，很难分离和纯化，且数量随年龄增长而降低。最近，利用流式细胞仪或免疫磁珠结合免疫标志物进行分选能够得到较高纯度的成体干细胞，有望解决这一问题[13]。其次，如果使用患者自身的干细胞进行治疗，首先必须从患者体内分离干细胞，体外培养使其增殖至足够数量用于治疗，但对于一些急性病症，无法有足够的时间进行患者自身的干细胞培养。另外，从成人身上获得的干细胞，增殖能力较年轻人的干细胞弱，加之成体干细胞可能包含一些DNA异常，这些潜在的弱点也将限制成体干细胞的应用。新近的研究表明成体干细胞并非能够完全相互转化，有些成体干细胞可能转化为一种或两种其它组织细胞，但并不具有胚胎干细胞的多潜能性，对成体干细胞可塑性提出了质疑[14]。所以，我们也应该清楚真正将干细胞应用于临床治疗各种疾病还有许多基础研究等待我们去做。相信随着干细胞研究的深入，将为临床众多疾病包括脊髓损伤、神经退行性疾病、糖尿病、心肌梗死等的治疗带来新的曙光。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关键词：胚胎干细胞；成体干细胞；神经干细胞；胰腺干细胞
中图法分类号：R329.24 文献标识码：A

参考文献：

[1] Kirchhof N, Harder F, Petrovic S, *et al*. Developmental Potential of Hematopoietic and Neural Stem Cells: Unique or All the Same[J]? Cells Tissues Organs, 2002, 171(4): 77—89.

[2] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145—1147.

[3] Shamblott M J, Axelman J, Wang S, *et al*. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13726—13731.

[4] van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells[J]? Science, 2000, 287(5457): 1439—1441.

[5] Bjornson C R, Rietz R L, Reynolds B A, *et al*. Turning brain into blood: a Hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*[J]. Science, 1999, 283(5401): 534—537.

[6] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707—1710.

[7] Reynolds B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci, 1992, 12(11): 4565—4574.

[8] Johnasson C B, Momma S, Clarke D L, *et al*. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nerveous system[J]. Cell, 1999, 96(1): 25—34.

[9] Davis A A, Temple S. A self-renewing multipotential stem cells in embryonic rat cerebral cortex[J]. Nature, 1994, 372(6503): 263—266.

[10] Clarke D L, Johansson C B, Wilbertz J, *et al*. Generalized potential of adult neural stem cells[J]. Science, 2000, 288(5471): 1660—1663.

[11] Kempermann G, Kuhn H G, Gage F H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment[J]. Nature, 1997, 386(6 624): 493—495.

[12] Svendsen C N, Smith A G. New prospects for human stem cell therapy in the nervous sysem[J]. Trends Neurosci, 1999, 22(8): 357—364.

[13] self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver[J]. JCB, 2002, 156(1): 173—184.

[14] Castro R F, Jackson K A, Goodell M A, *et al*. Failure of Bone Marrow Cells to Transdifferentiate into Neural Cells *in vivo*[J]. Science, 2002, 297(5585): 1299.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)01-0003-01

个案与短篇

坏疽性脓皮病 1 例

A case report of pyoderma gangrenosum

杨卫兵，郝 进，郝 飞 （第三军医大学附属西南医院皮肤科，重庆 400038）

1 临床资料

患者，男性，59 岁，近 8 年来无诱因反复于四肢和面部出现脓疱和溃疡，伴剧痛。曾用多种药物治疗无明显好转。自发病以来，精神差，食欲下降，体重减轻明显，大小便无异常。入院查体：一般情况差，慢性重病面容；浅表淋巴结不肿大；肺部可闻及少许细湿啰音；心脏及腹部体检无异常。面部、躯干、四肢远端可见散在黄豆至花生米大小不等脓疱及直径 4～6 cm 深的溃疡。

入院后查血常规 WBC 7.6×10^9/L，Hb 71 g/L，PLT 124×10^9/L；大便常规示潜血试验阳性；红细胞沉降率为 31 mm/h；肝功能示 Alb 32.3 g/L，G 36.9 g/L，A/G 0.9；胸部 X 线检查及 CT 扫描示：左下肺外基段高密度影，内见多个偏心空洞，提示肺结核或肿瘤可能；皮肤结核菌素试验（PPD）阴性；痰中多次镜检未找到抗酸杆菌和真菌；皮损组织病理学检查示：真皮内大量中性粒细胞浸润，未见血管炎改变；脓疱内脓液培养无细菌生长。诊断：坏疽性脓皮病。因肺部病变及消化道病变性质不明，建议患者进一步检查被拒绝。予以青霉素等抗感染治疗，皮损无好转且进一步扩大；予以琥珀酰氢化可的松 300 mg/d 静脉滴注，7 d 后病情明显好转，应患者要求转至当地医院治疗。

2 讨论

坏疽性脓皮病的发病原因和发病机制不明，治疗较为困难。现在我们对于该病的认识是建立在不断的文献报道的累积基础之上，因此缺乏完整性和系统性，易于造成临床的误诊和治疗不当。文献[1]报道，50% 以上患者合并有系统性疾病，最常见的为炎症性肠病（如溃疡性结肠炎、Crohn 病）、炎症性关节病和血液系统疾病或恶性淋巴瘤等。其内脏损害的发生率和预后各有不同，但一般认为内脏损害少见，肺部为最常见的发生部位[2]，表现为肺部的坏死性结节；此外该病还可侵犯肝、脾和骨骼[2,3]，表现为无菌性脓肿形成。

本例患者病史长达 8 年，表现为反复发作的多发性疼痛皮肤溃疡，实验室检查排除了感染性疾病，因此可以诊断为坏疽性脓皮病。并且有肺部结节性损害及肝功能受损的征象，但由于患者对检查不予配合，其肺部和肝脏病变的性质有待进一步观察。

（下转 6 页）

作者简介：杨卫兵（1968— ），男，湖南省冷水江市人，硕士，主治医师，主要从事皮肤疾病方面的研究。电话：（023）68754000-73149

收稿日期：2001-08-05；修回日期：2001-09-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net