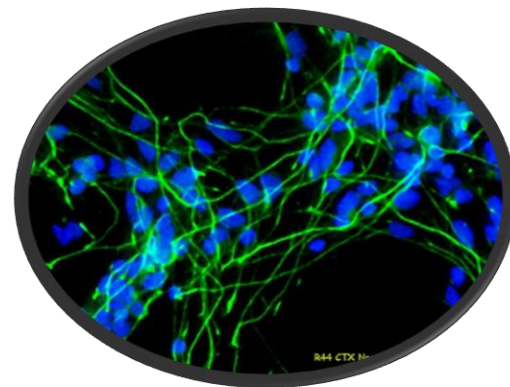
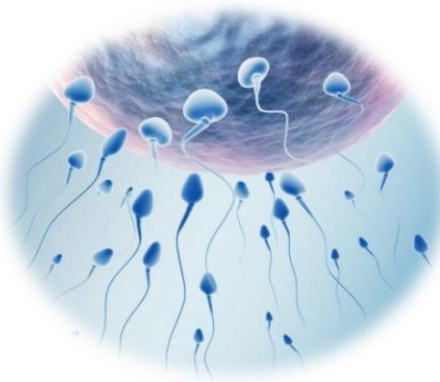
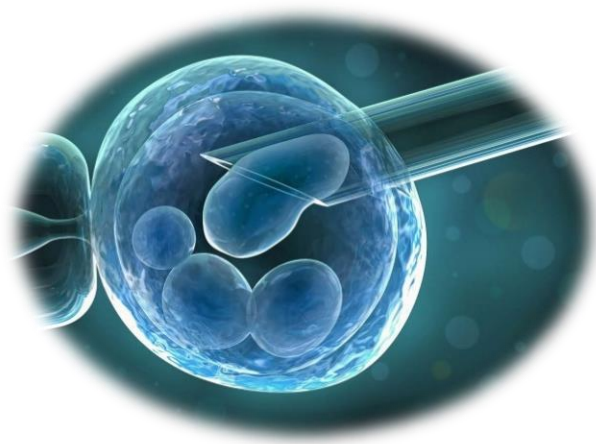




改变生活的生物技术

会“七十二变”的细胞-干细胞



超人的遗憾与梦想



- 超人具有超能力,刀枪不入,超级力量,超高,超级听力等。
- Christopher Reeve是第一代超人扮演者。因马术比赛意外导致脊椎受损,全身瘫痪,后致力于推动干细胞研究。2004年10月9日时,里夫因为心肌梗塞陷入昏迷,并于隔日逝世,享年52岁。



改变生活的生物技术

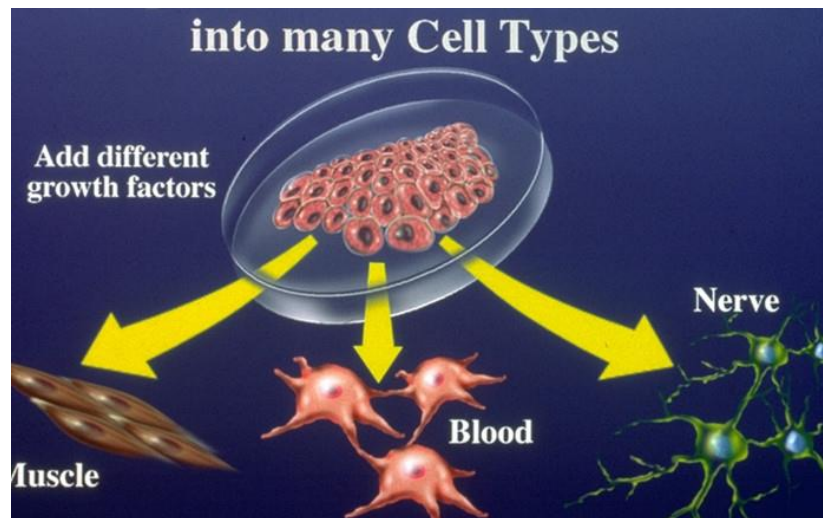
- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗



改变生活的生物技术

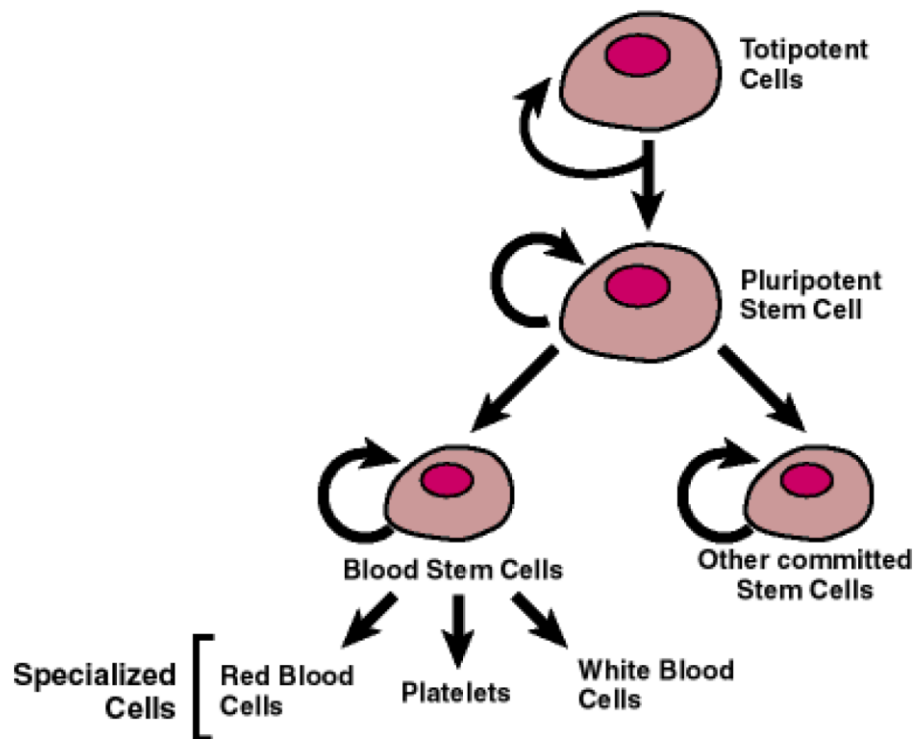
- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗

什么是干细胞?



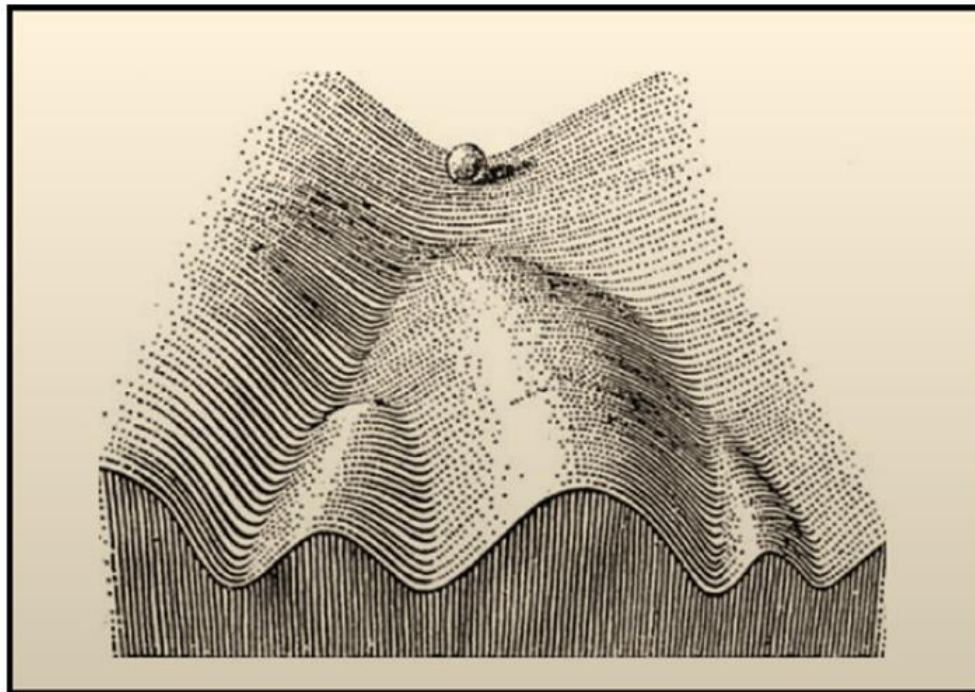
- 干细胞(stem cells)是一类具有自我复制能力(self-renewing)的多潜能细胞.干细胞在一定条件下, 它可以分化成多种功能细胞,它是形成哺乳类动物各组织器官的原始起源细胞。

干细胞的分化



- 细胞不断分裂趋于专门化的现象被称为**分化**。
- 正常情况下，一旦细胞分化为有专门功能的细胞，就不再具有形成其他功能细胞的能力。

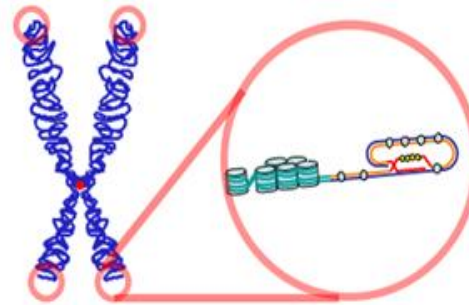
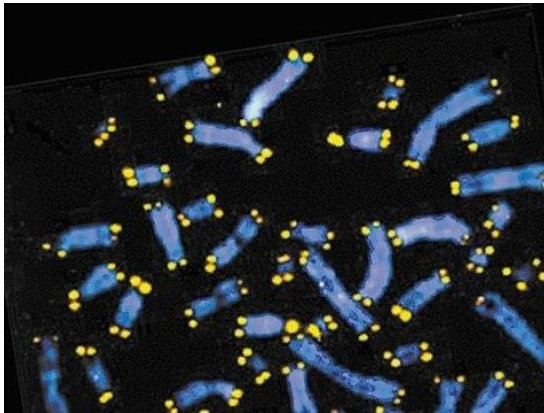
细胞分化后不能复原



1942 C.H. Waddington

细胞分化后不能复原的现象好比是从山顶滚向谷底的球

干细胞特征



染色体端粒

- 生化特征：具有**高端粒酶活性**。人类细胞每分裂一次，染色体末端的端粒短一截。端粒酶负责合成端粒DNA序列，从而来维持端粒的长度。
- 形态特征：**圆形或椭圆形**，核质比大。
- 增殖特征：**增殖缓慢且稳定**（与肿瘤细胞的本质区别）。
- 分化特征：具有**分化潜能**（金标准）。



干细胞研究发展简史

- 1908年，俄国组织学家Alexander Maksimov提出了干细胞的概念，他认为血液中所有的组分都来源造血干细胞。
- 1963年，加拿大科学家Joseph Altman和Gopal Das发现在小鼠骨髓中存在自我更新的细胞，证明了干细胞的存在。
- 1978年，在人类脐带血中发现了**造血干细胞**。
- 1981年，美国科学家Gail Martin和英国科学家Martin Evans建立**老鼠胚胎干细胞系**。
- 1998年，美国科学家James Thomson建立“**人类胚胎干细胞系**”。



改变生活的生物技术

- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗



干细胞种类

一、按发育阶段分：

- 胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell)
- 成体干细胞 (Adult Stem Cell)

二、按分化潜能分：

- 全能干细胞 (Totipotential Stem Cell)
- 多能干细胞 (Pluripotential Stem Cell)
- 专能干细胞 (Limited Potential Stem Cell)



干细胞种类

一、按发育阶段分：

- 胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell)
- 成体干细胞 (Adult Stem Cell)

二、按分化潜能分：

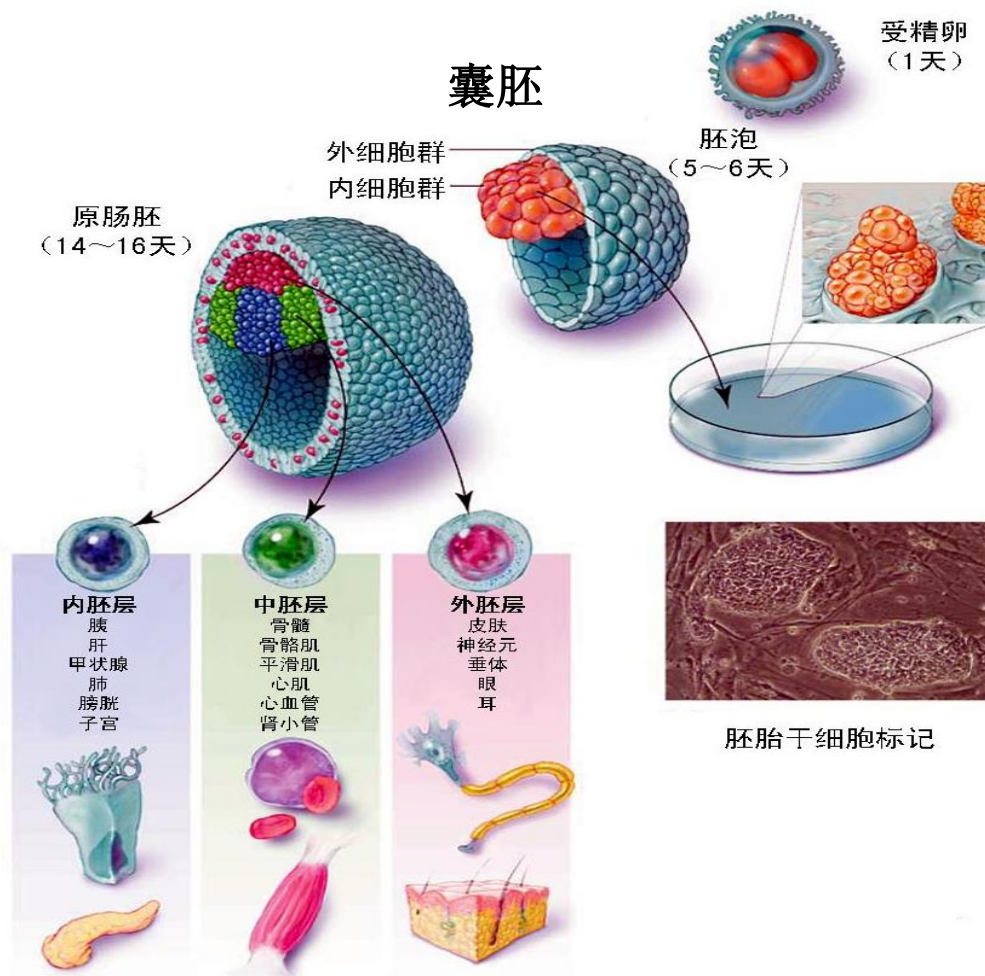
- 全能干细胞 (Totipotential Stem Cell)
- 多能干细胞 (Pluripotential Stem Cell)
- 专能干细胞 (Limited Potential Stem Cell)

胚胎干细胞 (ES细胞)

什么是胚胎干细胞？

- 来源于囊胚期的**内细胞团**，是一种高度未分化细胞，具有**发育的多能性**，能分化出成体动物的所有组织和器官，包括生殖细胞，参与胎儿所有组织器官发育过程。

(视频2)





体外小鼠ES细胞系的建立

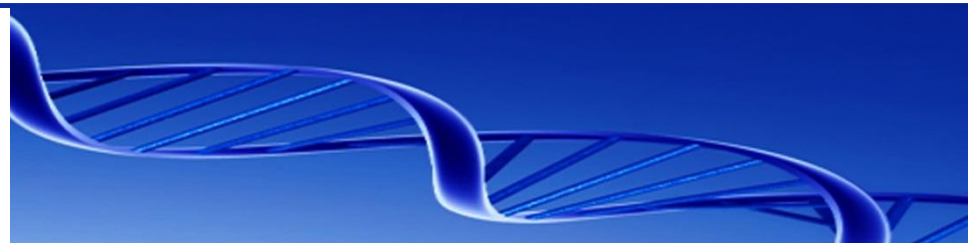
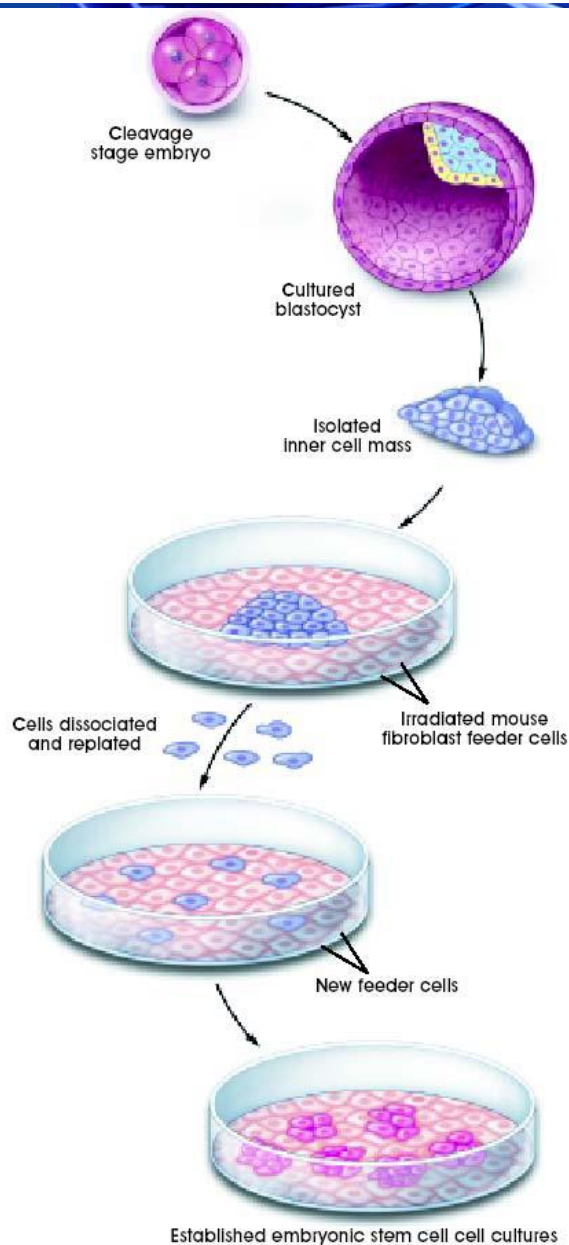


Sir Martin Evans
University of Cambridge
2007 Nobel prize



Gail Martin
UCSF

- 1981年，两组科学家在体外建立了小鼠的ES细胞系。
- Gail Martin首先提出了ES细胞的概念。



- 关键点：饲养细胞层提供了抗分化因子，如LIF, BMP



体外人ES细胞系的建立



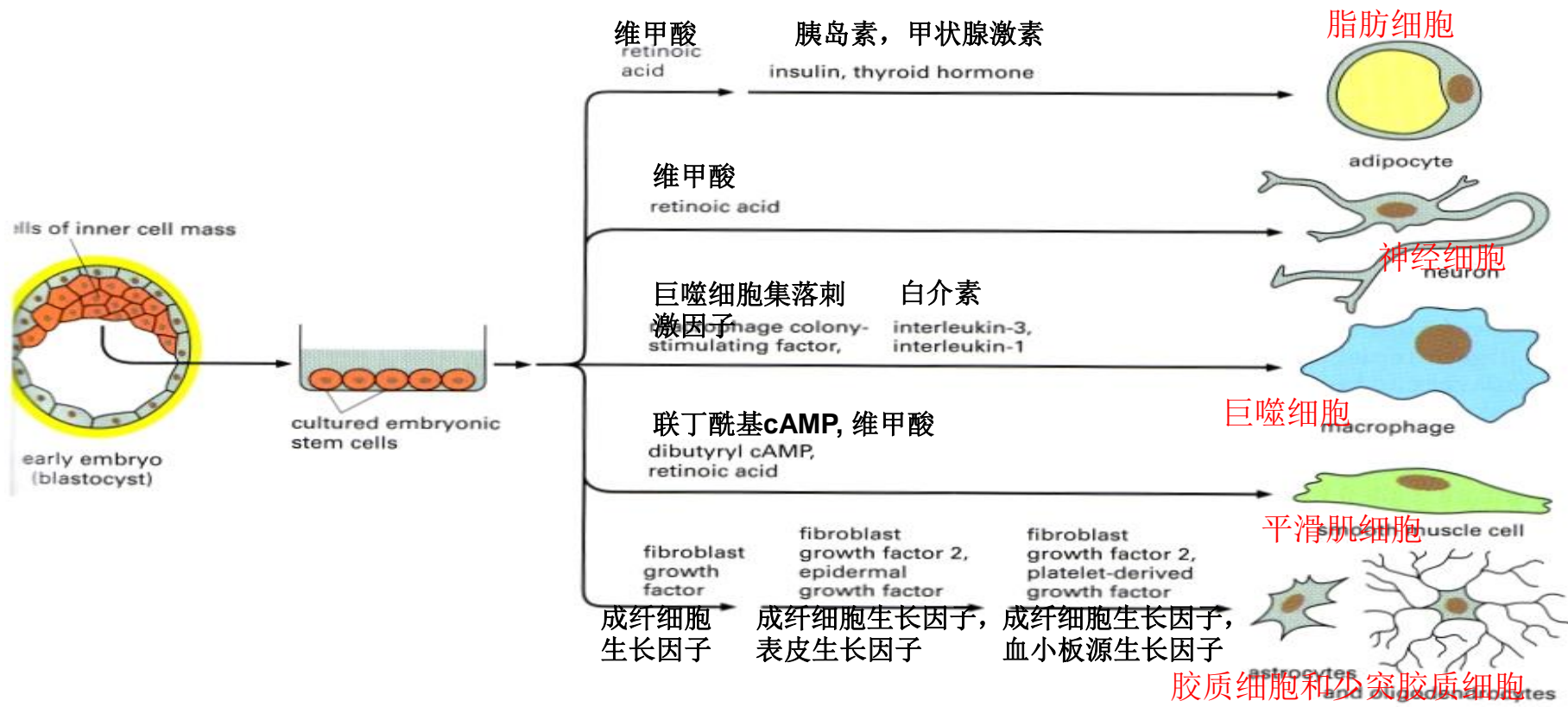
James Thomson
University of Wisconsin, Madison

- 1998年, James Thomson 利用自愿捐献的, 在治疗不育症过程中多余的胚胎在体外建立了人的ES细胞系。
- 建立的策略与小鼠ES细胞系相同。

Science (1998) 282: 1145-1147

干细胞的分化

- 在不同因子的处理下，胚胎干细胞可以分化为除胎盘以外所有组织的细胞，包括脂肪细胞，神经细胞，巨噬细胞，平滑肌细胞，星形胶质细胞和少突细胞。（视频3）





干细胞种类

一、按发育阶段分：

- 胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell)
- 成体干细胞 (Adult Stem Cell)

二、按分化潜能分：

- 全能干细胞 (Totipotent Stem Cell)
- 多能干细胞 (Pluripotent Stem Cell)
- 专能干细胞 (Limited Potential Stem Cell)



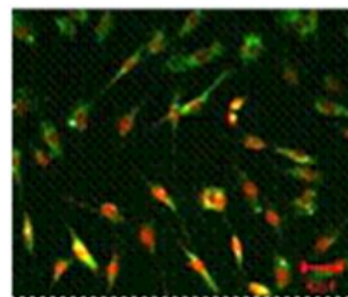
成体干细胞

- 成体干细胞是存在于成体动物的已分化组织中的未分化细胞，可以自我更新，同时在一定的条件下也可以分化，产生各种特异的细胞类型
- 成年动物的许多组织和器官，比如表皮和造血系统，具有修复和再生的能力。成体干细胞在其中起着关键的作用。在特定条件下，成体干细胞按一定的程序分化，形成新的功能细胞，从而使组织和器官保持生长和衰退的动态平衡

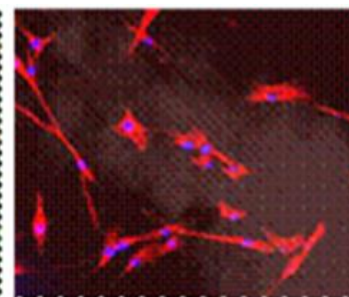
成体干细胞

成体干细胞的种类：

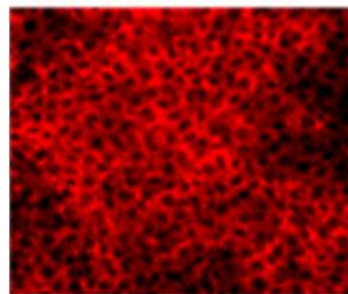
- 造血干细胞、
- 神经干细胞、
- 间充质干细胞、
- 脂肪干细胞。
-



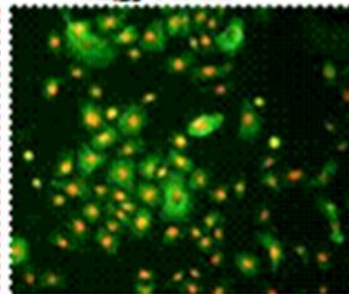
骨髓间充质干细胞



脂肪干细胞



表皮干细胞



毛囊干细胞

(视频4)



干细胞种类

一、按发育阶段分：

- 胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cell)
- 成体干细胞 (Adult Stem Cell)

二、按分化潜能分：

- 全能干细胞 (Totipotent Stem Cell)
- 多能干细胞 (Pluripotent Stem Cell)
- 专能干细胞 (Limited Potential Stem Cell)

按分化潜能分类

- **全能干细胞**

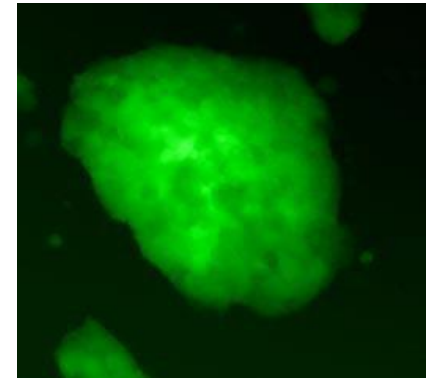
具有形成完整个体的分化潜能，受精卵分裂3次以内的细胞是全能的。

- **多能干细胞**

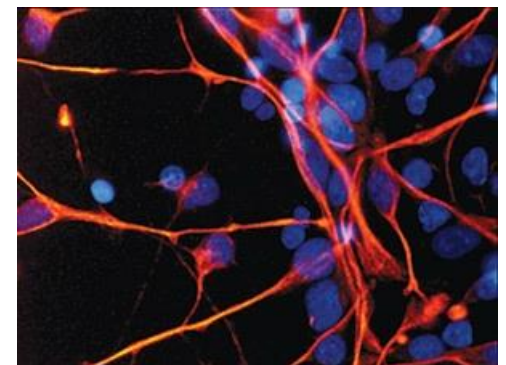
可以分化除了胎盘以外的绝大多数的器官，如ES细胞。

- **专能干细胞**

已经失去了多能性，只具备了分化成具有专门功能的细胞的能力。如造血干细胞，神经干细胞等。



胚胎干细胞



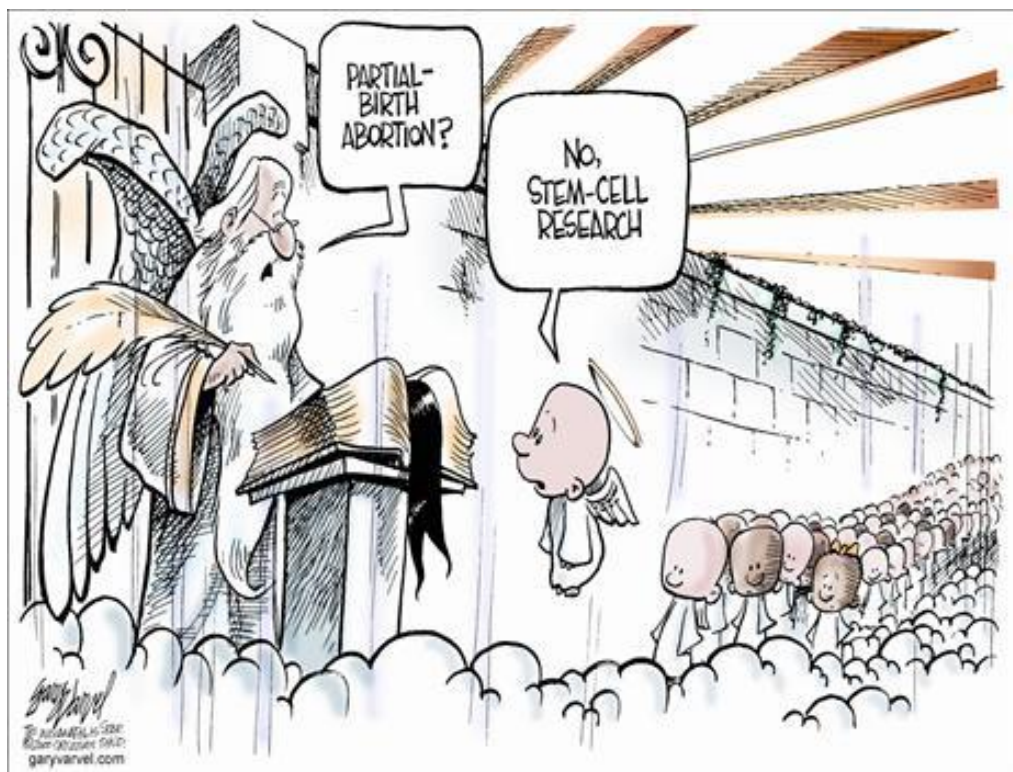
神经干细胞



改变生活的生物技术

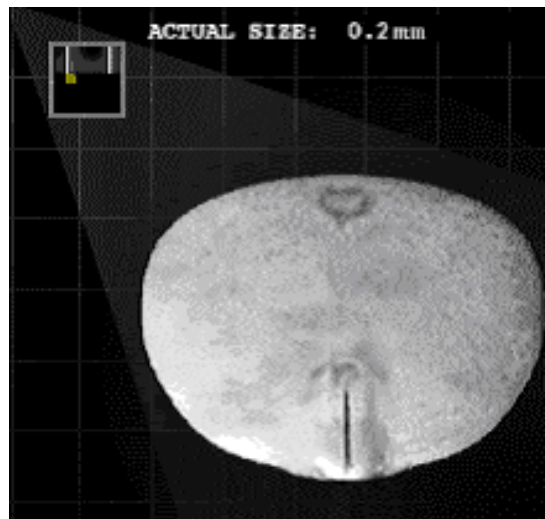
- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗

人类胚胎干细胞引发的伦理问题



- 胚胎干细胞具有多能的分化潜能，因此在临床和科研上的用途最大。
- 但是，人类胚胎干细胞系的建立和研究会损伤或者毁坏胚胎。
- 在某些人看来，胚胎也是生命，因此这种做法侵犯了人权。

什么时候开始算“人”？



胚胎发育14天时
出现原条

- 胚胎发育14天后，神经系统出现，意识可能出现，因此可被视作人。该定义受到多国科学家的支持。
- 中国的“人胚胎干细胞研究伦理指导原则”说明：胚胎体外培养时限不得超过14天。
- 胚胎干细胞诱导成的胚胎，在培养14天之前不算人。



各国对胚胎干细胞研究的管理规定

- 日本、澳大利亚、加拿大等允许使用体外受精丢弃的受精卵获取胚胎干细胞；
- 中国、韩国、印度、以色列、新加坡允许治疗性克隆；
- 英国最宽松，不但允许治疗性克隆，还允许在严格管理和监控下的生殖性克隆；
- 美国：变化（布什“禁止”；奥巴马“允许”）

美国对于干细胞研究的态度变化

- 2001年，美国总统小布什发布政令，限制联邦经费用于胚胎干细胞的研究。2009年，奥巴马上台后解除禁令。





常规的胚胎干细胞制备方法

- 从胚胎中分离提取干细胞

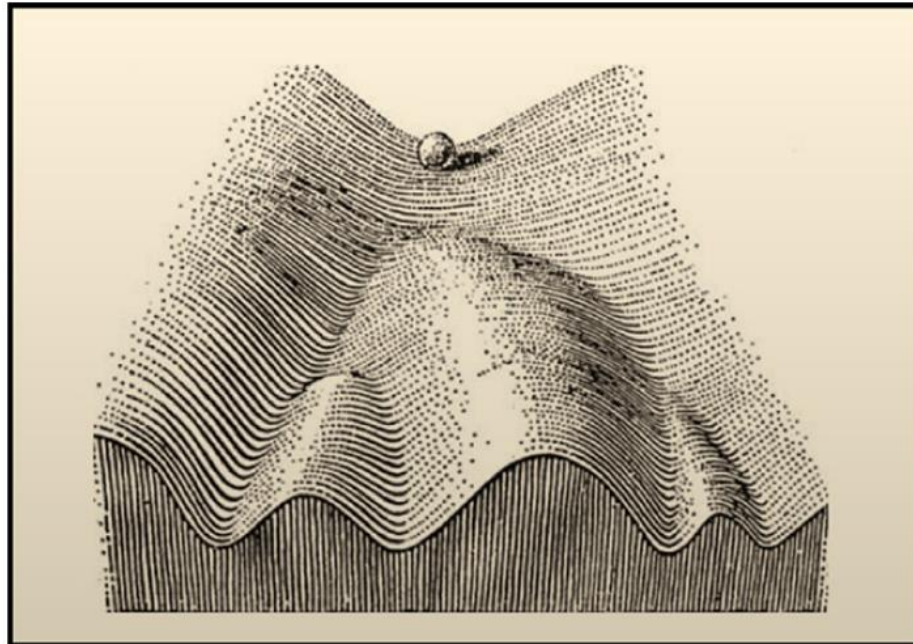
采用James Thomson的方法，但胚胎来源受到限制

- 核移植技术制备干细胞

采用与克隆羊“多利”相似策略，将体细胞核移植到卵细胞中，来制备胚胎干细胞。该方法存在技术难关，在2013年之前一直没有突破。该方法还需要提供卵细胞。

- 技术难度和伦理问题导致发展新的胚胎干细胞制备技术非常必要！

滚到谷底的球还能回到山顶吗？



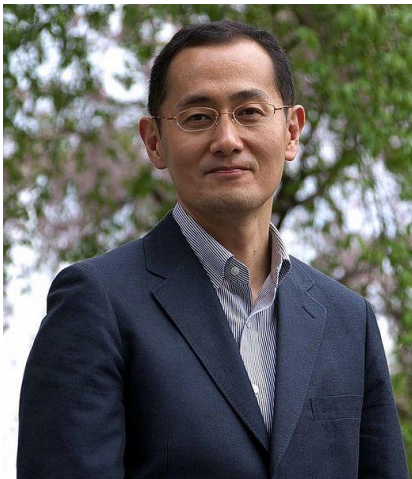
1942 C.H. Waddington

- 谷底的球是分化后的体细胞，山顶的球是胚胎干细胞。
- 把滚到谷底的球推回山顶，就可以获得胚胎干细胞！



改变生活的生物技术

- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗



山中伸弥

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

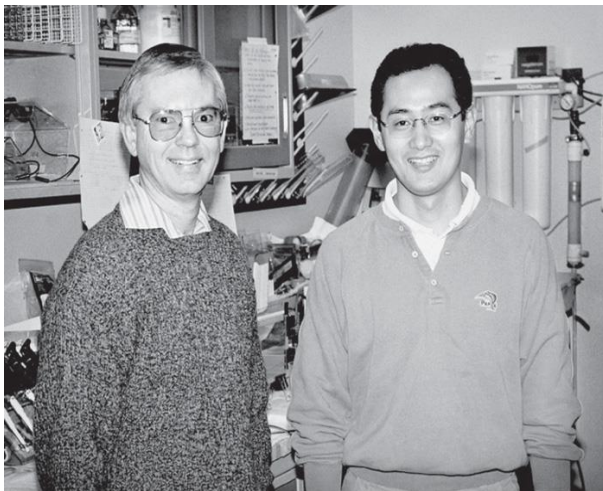
DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

Cell (2006) 126: 663–676.

- 2006年8月25日，京都大学的山中伸弥在*Cell*上发表论文，宣布可以将小鼠的皮肤细胞，诱导为具有多种分化潜能的干细胞。
- 这种细胞被成为诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS cells)。



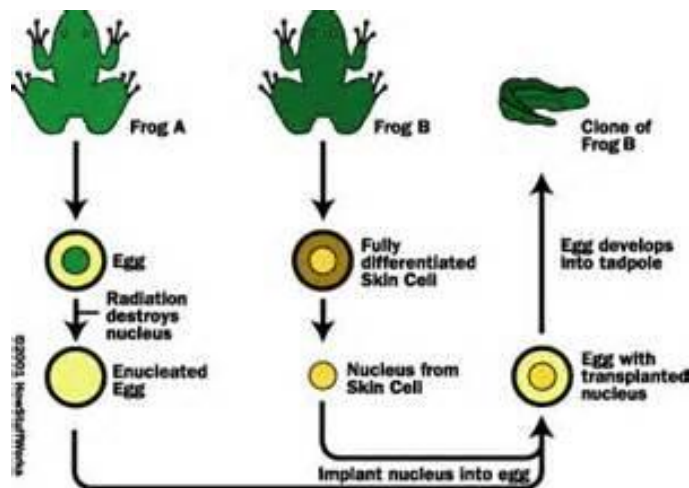
从外科医生到胚胎干细胞学家



山中伸弥和导师Thomas Innerarity 在Gladstone研究所

- 国立神户大学医学部失败的骨科实习生
- 大阪市立大学博士
- Gladstone研究所博士后：从失败的胆固醇代谢研究转到干细胞研究
- 大阪市立大学助理教授：PAD综合症

开启不可能的任务



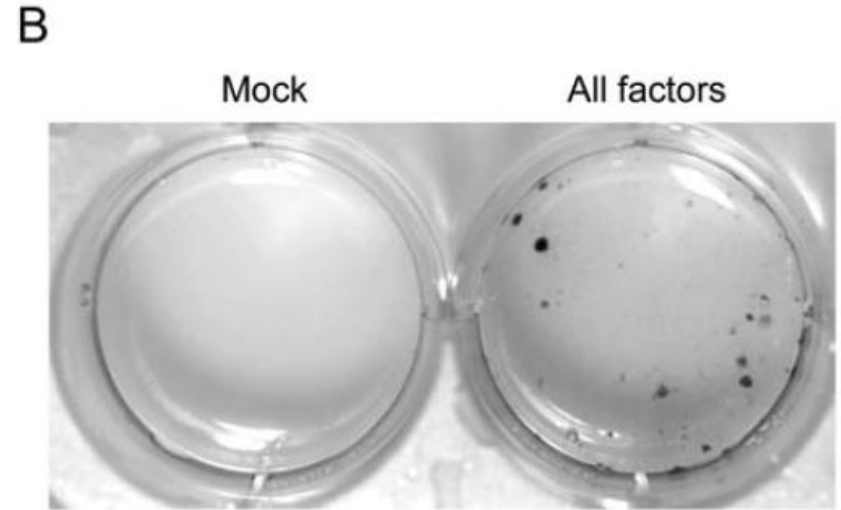
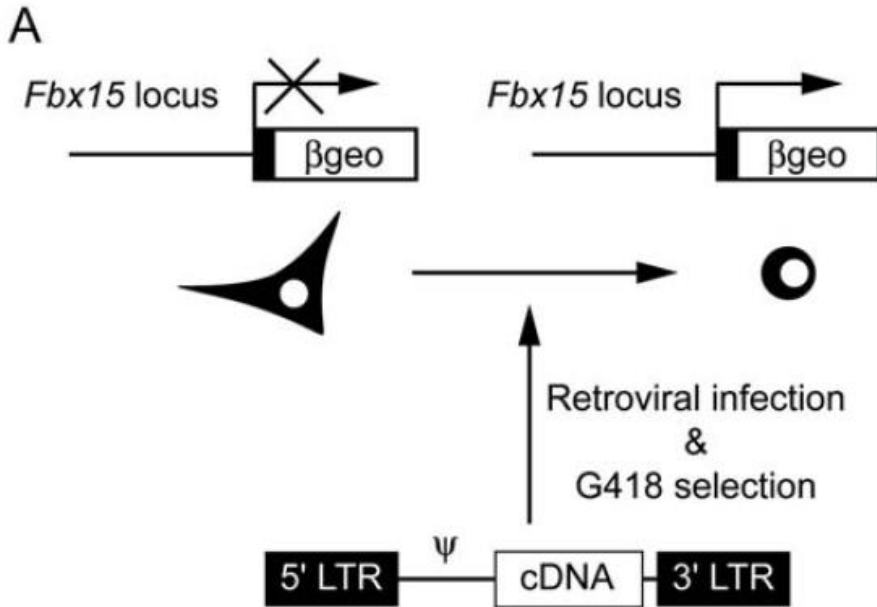
Gurdon的体细胞克隆实验



Dolly

- 奈良先端科学技术研究生院副教授：
将分化的成体细胞变回多能的干细胞。
Gurdon实验和Dolly的提示
失败的Fbx15

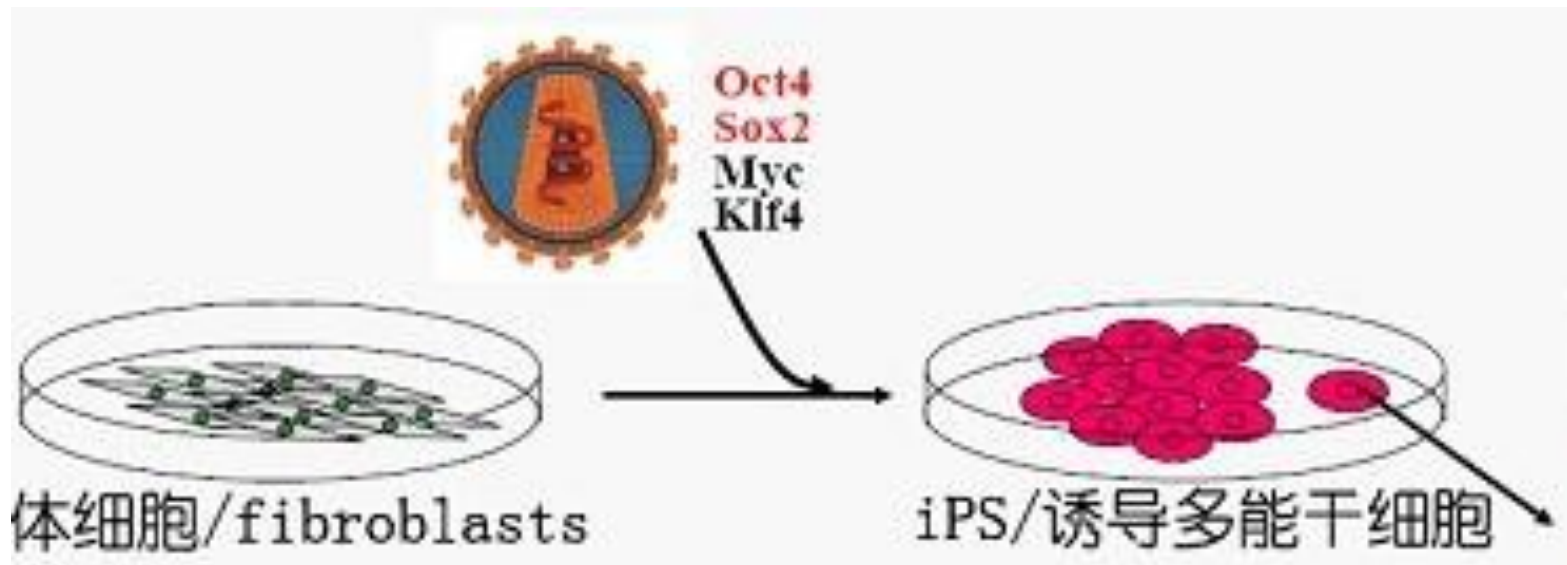
完成不可能的任务



Cell (2006) 126: 663–676.

- 京都大学副教授
Fbx15的“废物”利用
24个因子的转化，完成不可能的任务

神奇的4因子



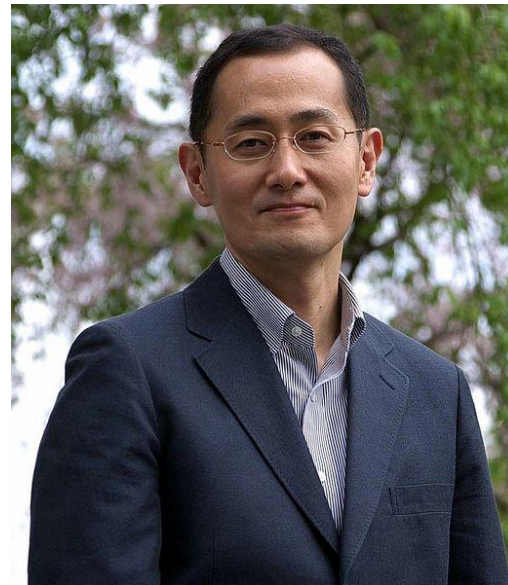
- 经过筛减，只需要4个转录因子基因，可以获得iPS细胞。
- 干细胞的特性是由一个基因网络来维持，通过上调某些关键基因可以重建这个网络，从而逆转细胞的命运。



人类诱导多能干细胞的建立



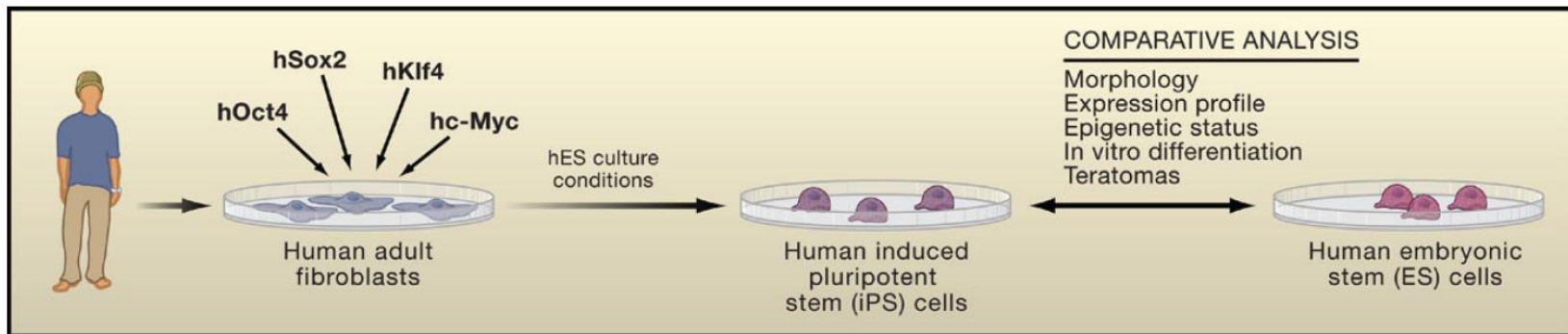
James Thomson



山中伸弥

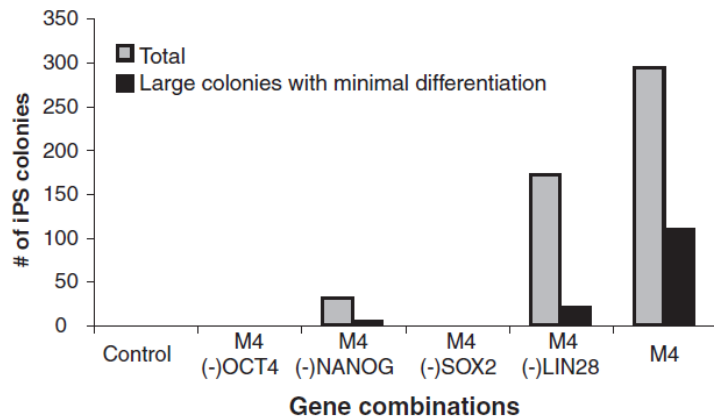
- 2007年11月20日，James Thomson和山中伸弥分别在*Science*和*Cell*上发表论文，同时宣布找到了4个初始化基因，利用人的皮肤细胞，成功培养出诱导多能干细胞。

神奇4因子在人中也奏效



Cell. 2007 Nov 30;131(5):834-5.

A



- 山中伸弥:
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
- Thomson:
Oct4, Sox2, Lin28, Nanog

Science. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.



早期iPS细胞技术的问题

- 效率低

体细胞重编程iPS细胞的比例仅为0.01-0.1%

- 致癌风险

病毒载体、基因组插入；4因子中有2个癌基因



更高效、更安全的iPS细胞技术

- 用重组蛋白代替转录因子

代表人物：丁盛，美国加州大学旧金山分校Gladstone 研究所研究员



- 用化学小分子代替转录因子

代表人物：邓宏魁，北京大学生科院教授



小保方晴子事件



Haruko Obokata, a unit leader of the Riken Center for Developmental Biology in Kobe's Chuo Ward, wears a 'kappogi' garment during experiments. (Takuya Isayama)

小保方晴子

- 2014年1月，RIKEN的小保方晴子在*Nature*发表论文，提出采用酸浴和挤压等方法简便地培育出刺激触发的多能性获得细胞，简称STAP细胞。
- STAP细胞产生条件简单，不需要遗传操作，是对iPS细胞技术的革命性发展。



小保方晴子事件

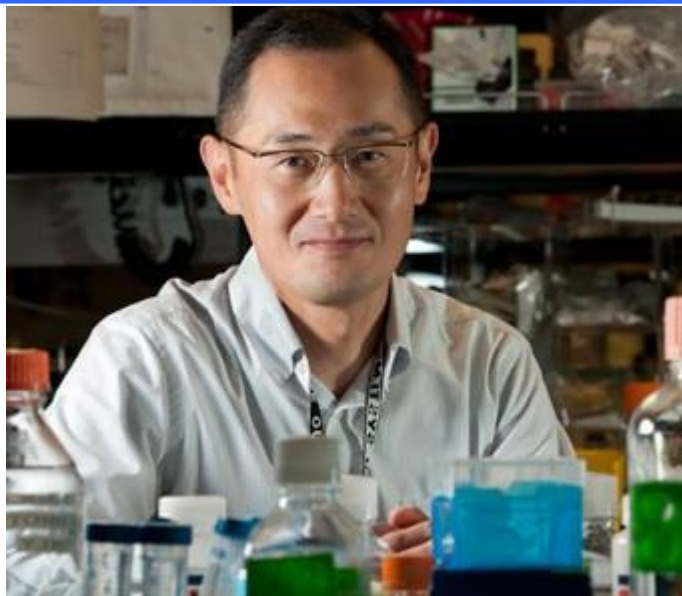


笹井芳树

- 论文确认造假。
- 2014年6月，小保方晴子的*Nature*论文被撤销。
- 2014年8月，小保方晴子的日方导师，干细胞科学家笹井芳树自缢身亡
- 2014年12月，小保方晴子从RIKEN辞职。
- 2015年11月，小保方晴子的博士学位被早稻田大学取消



iPS细胞的诺贝尔奖时刻



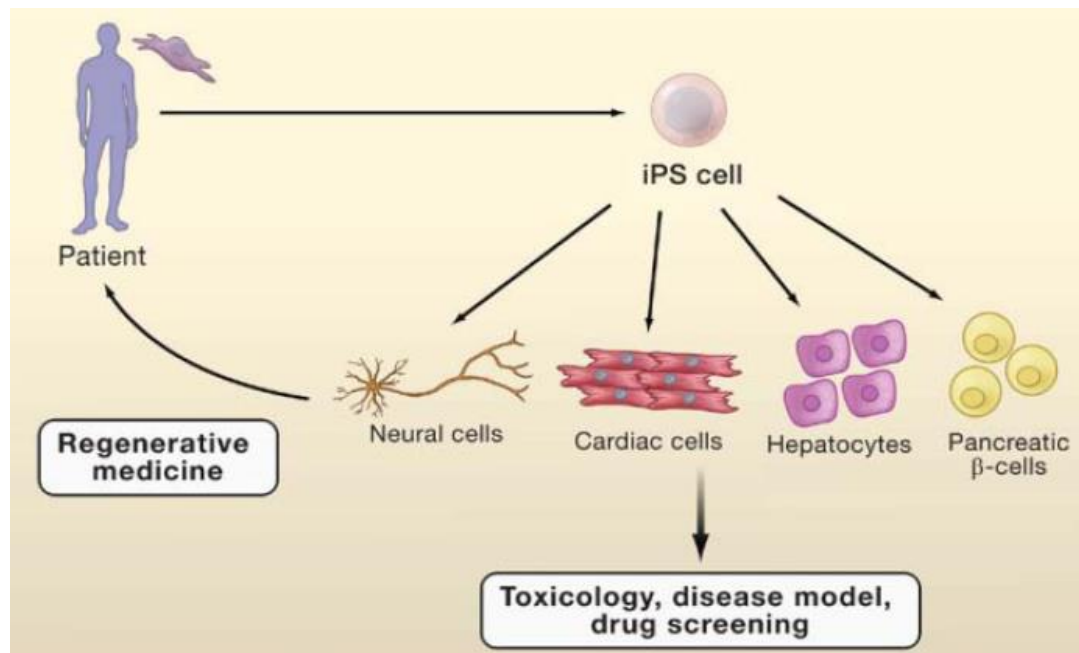
山中伸弥



John Gurdon

- 山中伸弥获得了2012年诺贝尔生理和医学奖。与其共同获奖是“体细胞克隆之父” John Gurdon。他们获奖的原因是“发现了成熟的细胞可以通过重编程，被逆转为多能的细胞”。

iPS细胞技术是新的里程碑



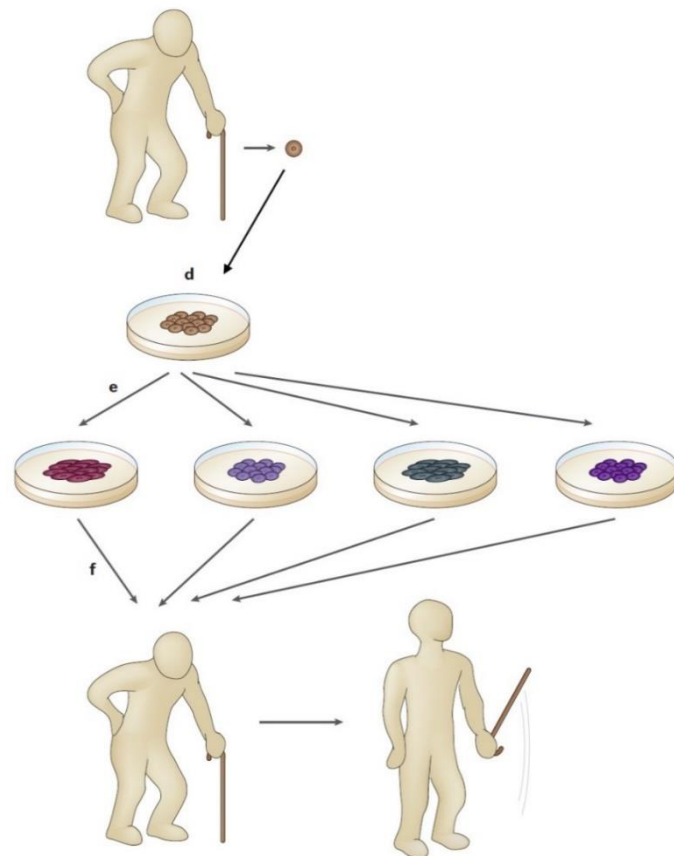
- 细胞来源方便，操作简单
- 使用自身细胞，减少免疫排斥。
- 规避了胚胎干细胞研究的伦理壁垒
- iPS细胞技术助推再生医学的快速发展。



改变生活的生物技术

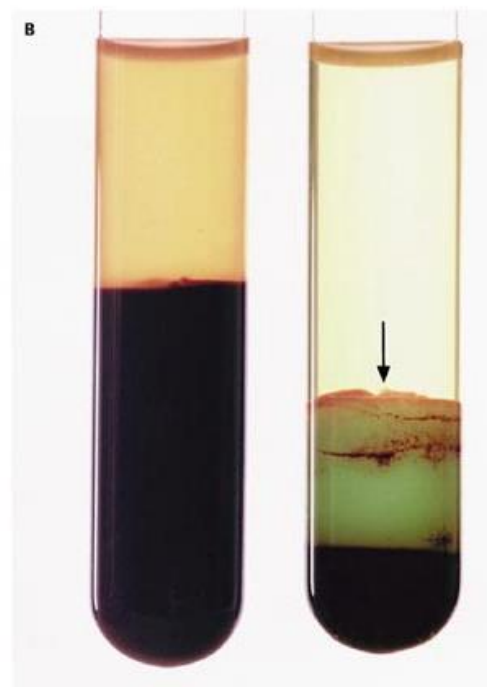
- 干细胞的概念
- 干细胞的分类
- 胚胎干细胞的伦理问题
- 横空出世的iPS细胞
- 干细胞治疗

- 干细胞治疗：利用干细胞的多能性，以干细胞为“种子”，培育出新的组织器官替换损伤的、自身病变或衰老的组织器官。
- 目前唯一成熟的干细胞治疗是骨髓移植



白血病

- 白血病，亦称作血癌，通常发病于骨髓，造成不正常的白血球大量增生。这些异常增加的白血球都尚未发育完成，称之为芽细胞或白血病细胞。大量增生的白血病细胞积聚并浸润其他器官和组织，同时使正常造血受抑制。

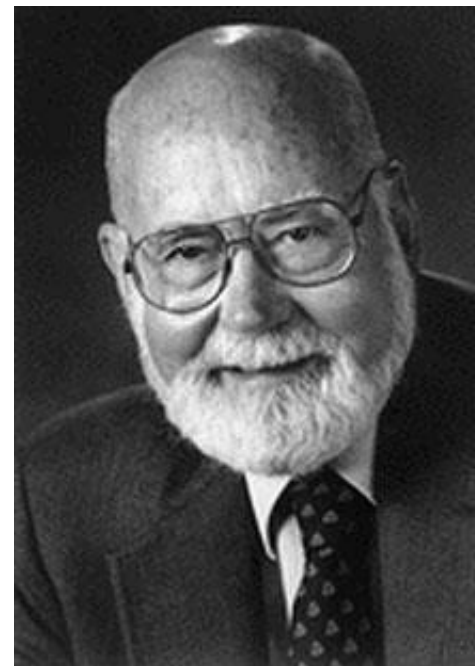


正常人的血液（左）
和白血病患者血液（右）



骨髓移植治疗白血病

- 1956年，Fred Hutchinson肿瘤研究所的E. Donnall Thomas进行了首例骨髓移植手术。
- 他向白血病患者注射新鲜的骨髓来治疗疾病。骨髓中发挥治疗作用的是造血干细胞。
- Thomas获得1990年诺贝尔生理或医学奖。



E. Donnall Thomas
University of Washington
1990 Nobel prize



治疗白血病的策略

- **白血病：**造血系统原始细胞出现恶性增生；治疗白血病的方法就是将这些恶性细胞全部杀灭。
- **化疗：**化疗不分敌我，在杀灭癌细胞的同时也杀死了正常的造血干细胞。如果这时候没有补充新的造血干细胞的话，病人生命可能会终结。
- **骨髓移植：**注入正常的造血干细胞，让病人恢复造血功能。
- **干细胞来源：**配型成功的志愿者的造血干细胞；出生时储存的脐带血或胎盘中的造血干细胞。

造血干细胞的采集

- 采集造血干细胞：一种是从捐献者髌骨中抽取骨髓血，第二种是**外周血中采集干细胞**，目前主要采用第二种，其流程方便，和普通献血过程相同。
- 方法：**注射动员剂**增加外周血中干细胞数量，数天后通过大臂采集全血，血细胞分离机提取干细胞，将剩余血液成份回输体内。
- 安全，简单，副作用小，人体经过1~2周时间可以恢复正常。



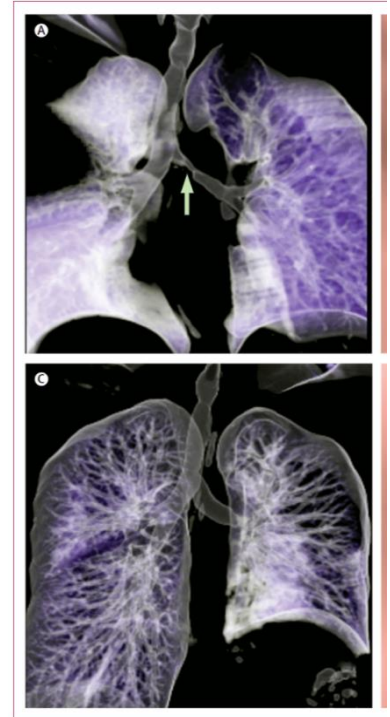
骨髓移植流程



- 患者清髓：患者接受大剂量化疗或化疗联合全身放疗，尽可能多杀死自身的造血干细胞，其中包括恶性细胞，为供者的造血干细胞准备“空间”。
- 移植：输注供者的造血干细胞，过程类似于输液。

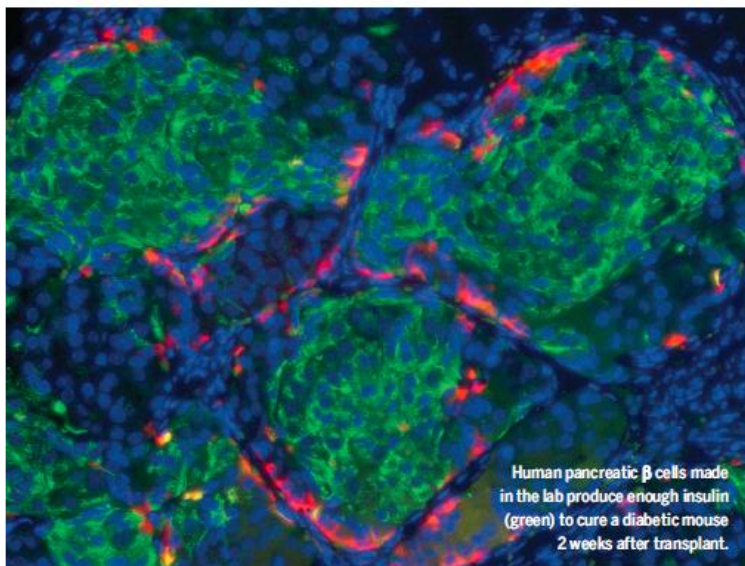
干细胞与气管移植

- 患者一个气管受损，呼吸困难。
- 2008年，西班牙科学家获得一位死者气管的胶原质结构。随后，从患者身上提取骨髓干细胞，送往英国，培养了600多万个作为气管壁的软骨细胞。
- 软骨细胞送往意大利，生长在气管的胶原质结构，用机器塑形。
- 在患者左侧主支气管上嫁接了定制的气管，该气管不会引起排斥反应。
- 两个月后，患者的肺部功能完全恢复。这是全球首例结构干细胞培植完整器官移植。



Lancet. 2008 Dec
13;372(9655):2023-30.

iPS细胞疗法治疗小鼠糖尿病



人类胰岛细胞(绿色)在小鼠体内生长

- 2014年10月，美国科学家在Cell上报道了将iPS或ES细胞转化为胰岛 β 细胞的研究。转化后的细胞植入小鼠2周后，可以产生了足够的胰岛素，缓解小鼠的糖尿病症状，这为治疗I型糖尿病提供了重要的方法。

iPS细胞疗法治疗小鼠糖尿病



D. Melton的一对儿女也是I型糖尿病的患者。

- 在I型糖尿病中，自身免疫系统杀死了胰岛 β 细胞，导致机体无法合成胰岛素。仅仅依靠外源的胰岛素很难维持I型糖尿病患者的血糖水平，补充正常的胰岛 β 细胞是治疗的重要手段。
- Harvard大学的D. Melton课题组历经十余年，研究能够将干细胞定向诱导为胰岛细胞的信号通路。该项工作被 *Science* 评为2014年十大科技进展之一。

2013年11月7日 Cell 封面

Cell

Volume 155
Number 4

November 7, 2013

www.cell.com

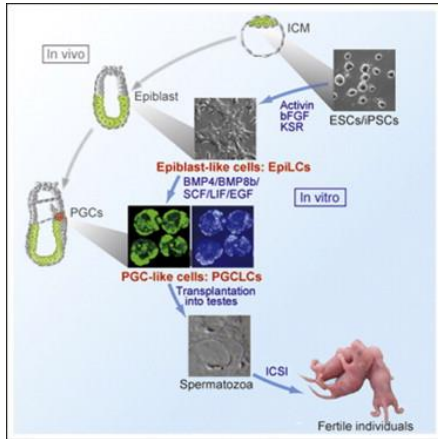


鱼

Cell, 155(4): 909–921, 2013

- 2013年，研究人员利用Zebrafish iPSCs 来逆转小鼠的肌肉萎缩症。而且，通过优化培养基成分，促进了肌肉细胞的再生。

iPS细胞转化为精子和卵子



iPS细胞转化为精子



由iPS细胞转化的卵子受精后获得的小鼠

- 2011年8月，京都大学的斋藤通纪(Mitunori Saitou)课题组在 *Cell* 上发表论文，报道了用小鼠iPS细胞转化为精子的实验。
- 2012年10月，同一课题组报道了用小鼠iPS细胞转化为卵子的实验。该项进展为治疗不育症提供了全新的途径。被 *Science* 评为2012年十大科技进展。



世界首例iPS细胞临床治疗试验

- 2013年7月，日本RIKEN眼科医生高桥政代领导团队开展iPS细胞临床试验。现年70岁的女性患者因老年性黄斑变性而出现视网膜损伤。研究团队提取了该患者的皮肤细胞，将其诱变为iPS细胞，并诱导这些细胞变成视网膜组织。
- 2014年9月8日，高桥政代提供证据显示这些细胞具有遗传稳定性和安全性。



Masayo Takahashi is the first to implant tissue derived from induced pluripotent stem cells into a person.

REGENERATIVE MEDICINE

Japan stem-cell trial stirs envy

Researchers elsewhere can't wait to test iPS cells in humans.



干细胞治疗在中国-真热!

LIU HAIYANG/XINHUA PRESS/CORBIS



It's boom time for firms selling stem-cell treatments, such as those derived from umbilical blood.

REGENERATIVE MEDICINE

China's stem-cell rules go unheeded

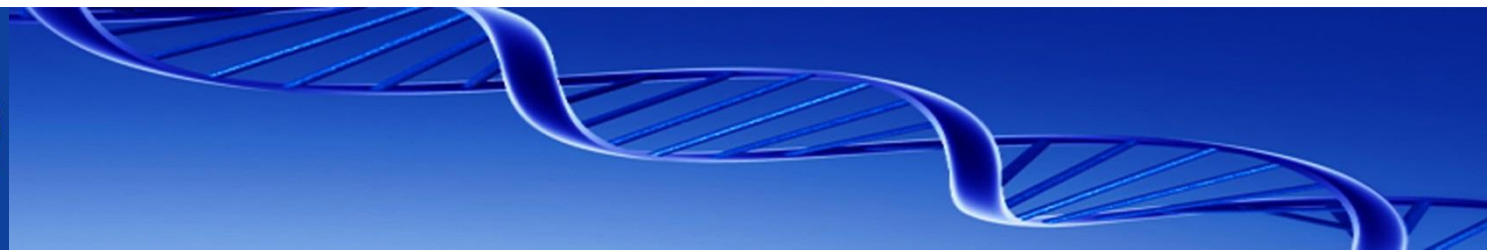
Health ministry's attempt at regulation has had little effect.

- 2012年，中国卫生部加大了力度强行禁止临床应用未经批准的干细胞治疗。然而，直到现在，全国各地的企业仍在向患者收取高达数千美金的费用提供这些未经验证的治疗。
- 2012年4月11日，*Nature*发布热点新闻，披露了这一现象。



中国的干细胞治疗

- 除个别项目外，干细胞技术仍处于临床前期或小规模临床试验研究阶段，安全性、有效性仍需认证，还未到达全面临床应用阶段。
- 我国尚未批准除造血干细胞治疗白血病外的任何干细胞临床项目。



谢 谢!

