

iPS重编程主要包括以下主要步骤（图12）。首先，携带有Oct4、Sox2、Klf4和Myc的重组病毒进入体细胞，并插入宿主的基因组。这些基因在病毒所带有的启动子的驱动下转录，在细胞质中翻译成这4种蛋白，然后进入细胞核启动其所能启动的第一批基因。然后，这些初始反应基因通过组蛋白修饰系统和DNA甲基化系统参与表观遗传学机制来重塑染色质。在这个过程中，对于多能性至关重要的基因必须被转录因子打开，并通过染色质重塑来保持这种打开状态。相反，负责分化的基因则必须被转录机制关闭，并通过表观遗传学机制保持沉默。iPS过程的一个显著特点是，带有重编程发起者Oct4、Sox2、Klf4和Myc的整合基因组的原病毒会在重编程完成后被沉默。因此，iPS细胞与来源于囊胚的胚胎干细胞在功能上难以分辨。

我们应该仔细研究所有这些机理步骤，以取得重编程过程的重要信息。生物化学家们可以选择将注意力集中在iPS过程中的两个关键事件上：转录激活/抑制和表观遗传学重塑。由于Oct4、Sox2、Myc和Klf4都是已知的转录因子，其作用方式现在需要进一步的调查。举例来说，他们如何与其它辅助激活子和聚合酶II复合体协同合作来打开和关闭他们的靶标基因？现在有足够的资料说明这些蛋白质如何接触DNA并参与转录机制。根据这四个基因协同工作的要求，了解它们如何在染色质上相互协调并决定哪些基因开启和关闭显得非常重要。与研究单个启动子和转录因子不同，iPS涉及多个转录因子和整个基因组。因此，可能需要新工具来深入探讨iPS重编程中相关的转录和表观遗传学过程。

文献来源：Duanqing Pei (2009), Regulation of Pluripotency and Reprogramming by Transcription Factors, *J Biol Chem.* 284(6):3365-9



GIBH干细胞与癌症研究组/编译

五、诱导性多能干细胞的临床应用

要把人多能干细胞（human pluripotent stem cell）应用到临床细胞疗法当中，还需要先进行一系列标准化的检测，对其稳定性（stability）、均一性（consistency）、致瘤性（tumorigenicity）、毒性（toxicity）和免疫原性（immunogenicity）等指标进行详细的评估。

在医疗领域，干细胞疗法可以说是最具发展潜力的一项疗法，有很多公司和研究机构已经开始了这方面的研究和开发。不过基于成体干细胞（adult stem cell）的疗法已经在临床上开展了几十年，早在1968年，我们就成功的进行了第一例骨髓移植手术。随着各种细胞疗法（cell therapies）技术的进步，各种监测手段也在不断发展。目前，美国食品与药品监督管理局（US Food and Drug Administration, FDA）使用《良好组织规范管理条例》（Good Tissue Practices Final Rule）来管理细胞疗法相关产品。该条例基于各种细胞产品的风险等级，按照等级

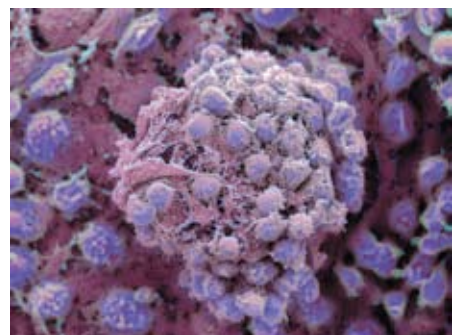


图13 图中所示的是在今年早些时候刚刚获得FDA批准，可以用于临床实验的来源于人胚胎干细胞的细胞产品相关图片。

系统来进行风险评估（详细情况见表7）。有一些细胞产品，比如Genzyme公司的Carticel产品（该产品是一款用来修复软骨的产品，以预先制成的自体同源的软骨组织物植入患者体内进行修复治疗，该产品可使患者的恢复期缩短而且外科医生可治疗更大的软骨缺损）和皮肤移植等方法都已经获得了FDA的审批（见表8）。虽然目前还没有干细胞产品获得FDA的批准，但是有好几款干细胞产品已经进入临床实验的最后阶段（见表8）。

基本上所有的多能干细胞（human pluripotent stem cell）疗法和大部分的成体干细胞（adult stem cell）疗法都是基于这样一种原理，即先将未分化的干细胞大量扩增，然后使其定向分化成我们需要的特定细胞，最后将这些治疗细胞回输给患者（不过不能确定细胞会在患

表7 细胞产品风险管理规范等级

风险等级	适用管理规范	产品具体说明	产品举例说明
1级	此级别不受FDA的21 CFR 1271管理规范	细胞产品不是人体细胞或组织产品；很少或不进行同源性操作；不与其他药物或仪器结合使用的产品	器官移植用器官、全血或全血来源细胞产品、大剂量化疗和（或）放疗后骨髓移植用骨髓
2级 (361条法令)	受公共健康与安全法令（Public Health and Safety Act）第361条管理	很少进行同源性操作的人体细胞或组织产品；不与其他药物或仪器结合使用的产品；自体使用血液相关产品或一级、二级血液相关产品	移植到左膝的右膝软骨；用于治疗血液系统肿瘤的从外周血纯化出来的CD34+血细胞；移植用角膜
3级 (351条法令)	受公共健康与安全法令（Public Health and Safety Act）第351条管理	体外培养或进行过非同源性操作的人体细胞或组织产品；与其他药物或仪器结合使用的产品；异源产品	用于传递溶酶体酶的人神经干细胞产品；用于心肌梗死患者心肌重建的人胚胎干细胞来源产品

者体内哪些地方“定居”下来）进行治疗。围绕这一治疗策略还开发出了一些辅助治疗的调控方法，这些辅助方法都是基于活细胞的基本特性开发出来的。不论在体内还是体外，细胞每经过一段时间都会发生一些改变，而且细胞通常都是处于一种异质性的（heterogeneous）环境当中，在移植之后会发生聚集和迁移，还会与宿主系统，比如局部微环境（local milieu）和免疫系统发生相互作用。不过来源于多能干细胞的细胞产品还具有一些其他的特性，其中最主要的有两点，即很强的复制能力（replicative capacity）和多潜能性（pluripotency）。这种细胞增殖（proliferate）能力一方面为大量制备商业化细胞产品提供了前提，但同时也向我们提出了一个挑战，即如何保证细胞在体外培养过程中的稳定性。而多能干细胞的多潜能性则允许细胞向多个分化方向进行分化，可以得到多种终末细胞产品，但同时也存在导致畸胎瘤（teratoma）和其他不需要细胞出现的危险。由此可见，对基于多能干细胞的细胞疗法进行监管是多么的重要。由于第一例使用人胚胎干细胞（human embryonic stem cells, hESCs）进行的临床实验即将开始，因此本文将重点关注这类细胞疗法，在文章的倒数第二部分我们还将对与诱导式多能干细胞（induced pluripotent stem cells）相关的几项事宜进行介绍。

要证明人胚胎干细胞相关细胞产品的安全性，需要对起始原料（starting material）进

行评估，对细胞的复制差异性（reproducible differentiation）和细胞生产过程进行评估，还要对最后细胞产品的均一性和体内特性，比如生物分布性（biodistribution）、致瘤性（tumorigenicity）、毒性（toxicity）和免疫原性（immunogenicity）等指标进行详细的评估。其中有些指标已经在有关细胞疗法的论著中进行过详细的讨论，本文，我们将对那些更重要的问题进行介绍，包括人胚胎干细胞来源问题，细胞产品稳定性（stability）、均一性（consistency）、致瘤性（tumorigenicity）、毒性（toxicity）和免疫原性（immunogenicity）等问题。

表8 已获批准上市或者已经进入后期临床实验的细胞疗法产品

产品名称	产品介绍	产品适用范围	产品目前获批准情况
Carticel	来源于自体软骨细胞	软骨移植	已获批准上市
Epicel	来源于自体成纤维细胞	皮肤移植	已获批准上市
Dermagraft	来源于异体成纤维细胞	皮肤移植	已获批准上市
Transcyte	来源于异体成纤维细胞	皮肤移植	已获批准上市
Apligraf	来源于异体成纤维细胞	皮肤移植	已获批准上市
Prochymal	来源于人成体间质干细胞	移植抗宿主病	已进入3期临床实验
MyoCell	来源于自体骨骼肌成肌细胞	充血性心衰患者	已进入3期临床实验
ALD-101	来源于脐带血细胞亚类细胞	遗传性代谢性疾病；溶酶体储存障碍性疾病（lysosomal storage disorders）；过氧化物酶储存障碍性疾病（peroxisomal storage disease）；造血干细胞移植	已进入3期临床实验

▶ 人胚胎干细胞来源问题（Derivation of hESCs）

到目前为止，大部分的人胚胎干细胞细胞系都只是用于科研领域，这些干细胞都饲养在小鼠滋养层细胞饲养层上。现在，FDA还没有给出具体的指导意见来专门规范临床用hES细胞的制备问题。因此，我们只能依据现有的体细胞疗法（somatic cell therapies）操作规范来进行相关操作。在现有的体细胞疗法操作规范中，临床用hES细胞必须严格按照《人体细胞组织优良操作规范》（Good Tissue Practice, GTP）和《药品优良制造规范》（Good Manufacturing Practice, GMP）的要求进行操作。这首先需要组织和细胞的供体符合相关条件，组织、细胞的复苏（recovery）、筛选（screening）、检测（testing）、处理（processing）、储存（storing）、标记（labeling）、包装（packaging）和分发运输（distribution）等各个环节也都必须严格按照FDA的21CFR 210&211条令规定进行操作（详见表9）。不过目前要按照GTP和GMP的要求来制备hES细胞还不现实。虽然临床上通过体外受精培养的胚胎能够让人成功受孕，但这并不符合GTP和GMP的要求。而且，GTP规范还要求对每一个供体的家族史和血样进行检查，这在现在的临床体外受精操作过程中通常都是没有的，也不太可能实施。

考虑到按照GTP和GMP标准制备hES细胞可能会碰到的“后勤保障（logistical）”问题，我们应该改变策略，从最实质的根本问题入手，即如何保证细胞产品不会受到外源性物质（adventitious agents）的污染。因此，从最开始的原始细胞材料到最终的细胞产品，均应该按照FDA制定的《细胞系若干需要考虑特征指南》（Points to Consider in the Characterization of Cell Lines guidelines）进行最彻底的仔细检查（详见表9）。对hES细胞进行仔细检查可以极大的降低由于不清楚供者相关资料所造成的风险。由于hES细胞具有极强的增殖能力，因

表9 开发干细胞疗法的若干管理规范参考资料

资料名称	资料下载地址
Guidance for Reviewers Instructions and Template for Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Reviewers of Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)	http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/03d0349gdl.pdf
Guidance for FDA Reviewers and Sponsors Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)	http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Xenotransplantation/ucm092705.pdf
Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans	http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Xenotransplantation/ucm092707.pdf
Guidance for Industry Regulation of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) Small Entity Compliance Guide	http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Tissue/ucm062592.pdf
Guidance for Industry Current Good Tissue Practice (CGTP) and Additional Requirements for Manufacturers of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps)	http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Tissue/ucm091408.pdf
Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (1993)	http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/OtherRecommendationsforManufacturers/UCM062745.pdf
Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy	http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072987.htm
Guidance for Industry: Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products	http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Tissue/ucm073964.htm

此即使不严格按照GTP的要求也能用hES细胞制得包含数量足够多的细胞用于对种源细胞库（master cell banks）和工作细胞库（working cell banks）进行外源性污染物质检测。今年1月，FDA批准了美国加利福尼亚州门罗公园(Menlo Park, CA, USA)Geron公司的一项研究中新药申请（investigational new drug application），同意Geron公司使用在实验室小鼠滋养层细胞上培养出来的第一代hES细胞系来源的少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte progenitor cells)。不过无论如何，随着干细胞疗法的发展，会出现越来越多的能够符合GTP和GMP规范的可用于临床使用的新型细胞系产品。已经有好几家科研机构和公司开发出了达到“临床应用级别（clinical-grade）”的hES细胞系，这些细胞系都是按照GMP规范生产出来的，经过了充分检测的可靠产品。其中有一家公司已经向FDA报告了他们的6套细胞系产品。

► 干细胞产品的均一性（consistency）

制备hES细胞系来源细胞产品的目的就是为了能够在高标准的无菌环境下持续获得大量可供临床治疗使用的细胞产品。这首先就需要一套操作流程，能繁殖培育出足够数量的未分化干细胞，进而进行定向分化。还需要一套有效的检测手段保证每一批产品的均一性，通常都是依靠GMP管理规范来保证产品的均一性。不过如何界定细胞产品的均一性这首先就是一个问题，因为与常见的小分子产品物质不同，细胞产品是一个个有生命的个体，它们都会随着时间而不断地变化。要保证细胞产品的均一性首先就要尽量缩小细胞来源之间的差异，严格控制细胞分化和制备过程，最后还要仔细检查最终产品的组份及其功能。图14形象的展示了制备干细胞产品过程中的关键步骤。

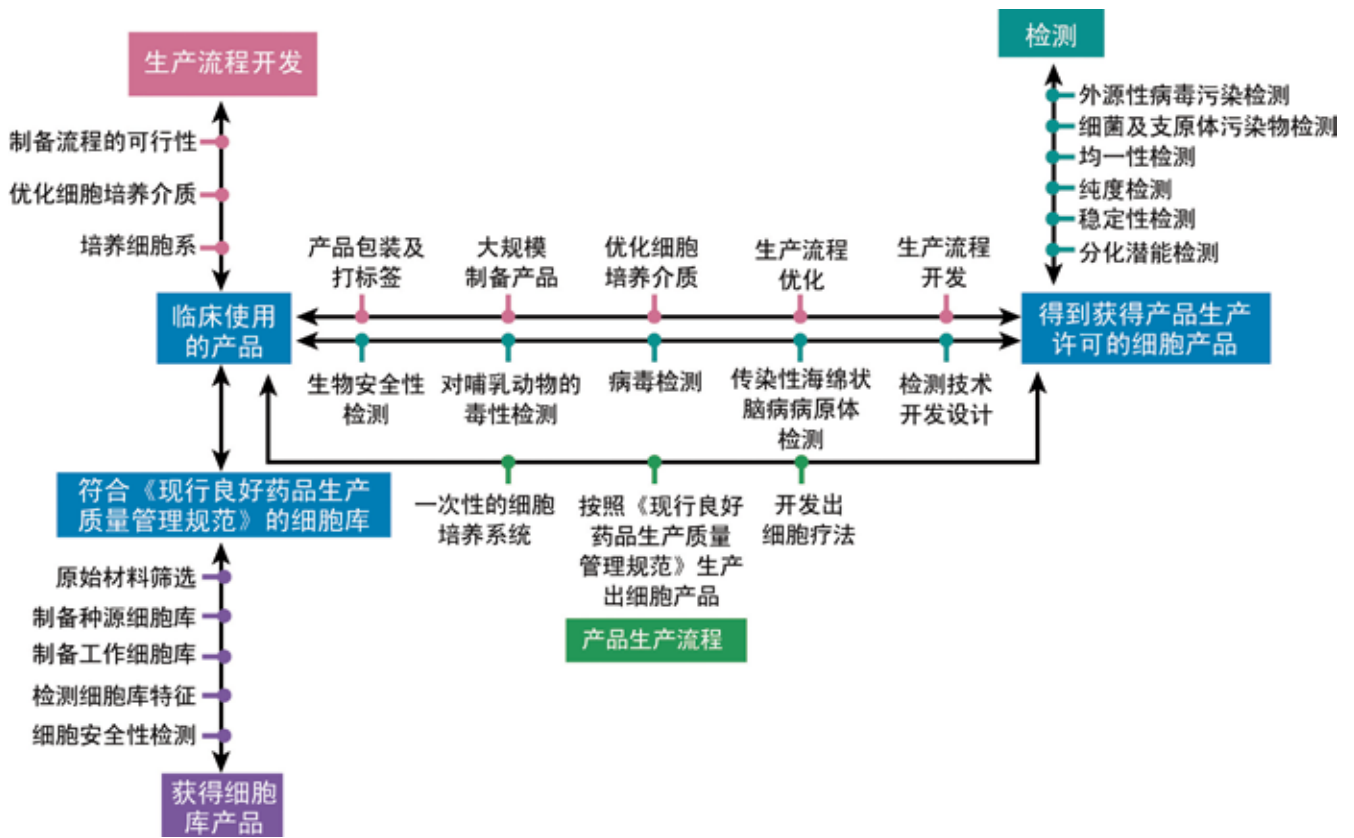


图14 图示说明干细胞产品研发制备过程中的各步骤。

按照细胞来源的不同保证细胞产品的均一性。目前基于hES细胞的疗法都是依照以下程序进行的，即先通过单细胞培养（single culture）获得纯系细胞群（cell population），然后再在体外大量培养获得hES细胞种源细胞库。如果细胞产品就像刚才提到的那样是来源于单一细胞系，那么细胞产品差异性可能就存在于一个个装有细胞的、组成hES细胞种源细胞库的小瓶中。对这些hES细胞种源细胞库的细胞组分进行仔细检查有助于排除这种差异性。不过出于HLA配型的需要，往往需要从多个供体那里获得细胞，然后制备出多个种源细胞库，这也就增加了解决产品均一性问题的难度。到目前为止，我们已经分离出了数百个不同的hES细胞系，不过还没有仔细比较过这些细胞系间的异同点。但是我们已经发现，这些不同hES细胞系在分化能力上有所差异。

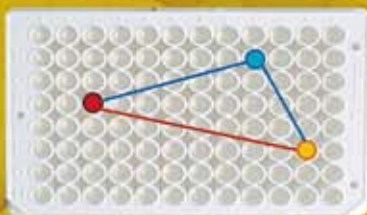
这一点也不奇怪，因为有研究者发现，在同一阶段，从不同供体采得的其他干细胞也会表现出差异，该研究数据目前尚未发表。hES细胞系之间的差异可能来源于分离细胞操作过程中的差异，也可能是因为分离时间的差异，是采自桑椹胚细胞（morula）还是采自外胚层细胞（epiblast）等，还有可能是由于个体等位基因的差异，这会导致细胞生长速度、分化能力、染色体核型稳定性（karyotypic stability）或者整合能力以及细胞体内功能等各方面的差异。

在局限更大的原始生物制品（sourcing biologics）范畴里（比如促红细胞生成素）也能观察到这种差异，不过可以通过限制这类生物制品的来源，或者采取更为严格的检测手段等办法来解决上述生物制品中存在的均一性问题。但是要将这些方法用到hES细胞制备工作中还存在很大的难度。虽然有研究人员就多能干细胞（pluripotent stem cells）的特征进行过研究，也取得了一些成果，但有关多能干细胞的这些特征与其安全性之间的关系尚不清楚。也有人用一些标准化的方法对hES细胞的特征进行过研究，比如用免疫细胞化学方法（immunocytochemistry）和PCR方法对hES细胞的多潜能标志物进行过检测，也检测过胚体（embryoid bodies）细胞和畸胎瘤细胞的核型及分化情况等。此外，还有人用芯片技术、基因表达系列分析技术（serial analysis of gene expression analysis, SAGE）、基因转录谱分析（transcriptional profiling）等技术对不同的hES细胞系进行过比较分析。其中M.R.科研小组根据芯片结果提出了一组“多潜能基因（pluripotency genes）”的概念。最近，通过对多个纯系细胞群进行分析后发现了一组可用于对hES细胞系进行评估的基因。不过虽然这些发现很吸引人，但是既没有被广泛接受，也没有被采纳作为干细胞产品临床使用前必须接受的检测措施。由于不同hES细胞系之间可能存在差异，因此我们建议应该对种源细胞库细胞的表型、基因型以及功能等各方面进行检测。表10列出了应该被检测的项目。

表10 hES细胞系特征

hESC细胞系特征	检测判断标准
细胞倍增时间	大约36小时
是否具有成纤维细胞生长因子（FGF）依赖性	是
是否具有分化能力	是
是否具有稳定的核型	是
SSEA-1标志物	缺乏
SSEA-3标志物	有
SSEA-4标志物	有
TRA-1-60标志物	有
TRA-1-81标志物	有
Oct4标志物	有
Nanog标志物	有
Sox2标志物	有
E-cadherin标志物	有
Brachyury标志物	缺乏
Pax6标志物	缺乏
APF标志物	缺乏

Primer Array (qPCR 芯片)



筛选您感兴趣的
表达基因和表达模式



原理

- Q-PCR Primer Array是基于SYBR Green染料法的Real-Time PCR检测技术，是对不同样品中具有相似生物功能的基因家族或自选的特异pathway基因进行表达量差异分析的系统。
- 该产品是把优化并通过实验验证的各对All-in-One™ Q-PCR Primer按使用浓度交联到96-Well-qPCR反应板中。
- 该产品使用时仅需加入All-in-One™ Q-PCR Mix，样品cDNA及PCR级H₂O即可上机反应。
- 通过Q-PCR Primer Array，研究人员可以快速、可靠、精确的筛选出感兴趣的特异基因和基因表达间的关系。

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874
USA
Tel: 301-515-6982
Fax: 301-515-6983
Web: <http://www.genecopoeia.com>

 **复能基因**
FulengGen

广州复能基因有限公司
地址：广州科学城国际企业孵化器D座8楼 510663
电话：(020)32052376、32052410、32290874
传真：(020)32052877
网址：<http://www.fulengen.com>
服务热线：020-32068595 020-32052376-666
电子邮箱：sales@fulengen.com

在细胞分化和制备过程中保证不同批次间产品的均一性。虽然我们一直在努力改进制造流程，希望能获得更加有效的细胞分化、纯化和分选制作工艺，但是最终获得的细胞产品始终不是绝对同质性的细胞。因此，我们需要一种高度可重复性的细胞分化制作流程，按照该流程操作总能获得完全由相同细胞组成的细胞群落产品。而且在细胞分化和制备流程里的一些关键控制点还应该对一些关键的细胞特征进行检测，比如细胞表型（phenotype）、倍增时间（doubling time）、活力（viability）、活性（activity）、细胞群落异质性（heterogeneity）。还应该进行一些安全性检测，比如无菌度（sterility）、内毒素含量（endotoxin level）、是否有支原体（mycoplasma）污染等等。

通过检测细胞产品组成情况来保证产品功能的均一性。一般来说，细胞产品可以被看做是由活性组分（即活性细胞）和其他“污染物”混合而成的不均一性混合物。其中的“污染物”可能是支持细胞（supporting cells）、辅助细胞（accessory cells）、未分化细胞（undifferentiated cells）或者其他与治疗目的无关的细胞。好的细胞制备过程应该能获得各批次间细胞组成比例固定（即活性细胞和污染物细胞比例固定）的细胞产品。

下文中我们还会详细讨论污染物细胞的存在问题，以及确定可接受的污染物细胞比例的重要性问题。还需要开发出合适的检测方法来对细胞产品进行功能评估，以便预测出这些细胞产品进入人体后的有效性和治疗潜力。不过这种检测方法会非常复杂，因为我们现在对活性细胞类型以及它们的作用机制都还不了解，也许会是多种作用机制综合起来才能发挥治疗作用。比如在脊髓损伤治疗中，治疗用细胞可能是通过髓鞘再生作用发挥治疗作用，也可能是通过释放生长因子发挥治疗作用，还有可能是上述两种机制共同发挥作用。开发出体外细胞活性预测技术可以减少对产品中各种组分进

行检测所花费的时间与金钱，以及优化制备条件，从而极大地推动细胞产品制备工艺的改良进程。

对最终细胞产品特性的检测情况取决于产品的细胞组成情况和它们的作用机制。比如用于治疗帕金森氏病（Parkinson's disease）的多巴胺能神经元细胞应该能够表达相应的细胞标志物，以及神经丝蛋白（neurofilament）和酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase），而不会表达未分化细胞或内胚层细胞（endoderm）、中胚层细胞（mesoderm）等才会携带的细胞标志物。细胞功能检测应该包括细胞去极化后释放多巴胺的能力以及植入体内后是否能够不再进行有丝分裂。再比如，如果施行细胞疗法是为了释放细胞因子以保护内源性细胞或者补充体内缺乏的内源性细胞因子，那么对细胞特征的检测就应该着重放在对细胞因子释放水平的检测上。

在评价细胞产品时表观特征（Epigenetic profiles）也具有非常重要的作用。到目前为止，FDA还没有要求检测细胞产品中某些关键基因的表达情况或者进行表观基因组（epigenome）方面的检测。不过一旦这种检测的效果被证实，那么它们对于判断细胞产品的特征将具有非常高的实用价值。通过检测组蛋白修饰情况和DNA甲基化情况来判断的表观稳定性检测将会是这类检测中的第一项。

如何界定细胞产品的均一性一直以来都是一大难题，而这正是因为多潜能干细胞具有的治疗特性本身使得我们难以界定它们的均一性。多潜能干细胞是动态的，对环境反应迅速的，同时又具有无限增殖能力的一种细胞。这些特性使得我们很难获得均一性的多潜能干细胞产品，不能确保各批次产品间的细胞组成情况都一致，也不能通过体外实验来预测这些细胞在体内的活性。对于使用iPS细胞进行的个性化医疗操作，每一“批次”产品都是针对某一个特定患者的，因此生产每一批次产品所用到的原始原料每次都会更换，这更是给评价产品的均一性带来了困难。不过无论如何，我们

都会继续努力找到如何解决均一性问题的办法，并对这些关键性指标（变量）进行监测。

► 细胞稳定性问题

细胞的稳定性问题源于在临床治疗时进行的细胞分裂操作。细胞经过很多代的倍增之后是否会变得不稳定甚至发生转化呢？实际上，在进行造血干细胞移植（这是目前应用范围最广的唯一一种干细胞疗法）治疗时就会出现比较罕见的并发症——供体细胞白血病（**donor-cell leukemia**）。这是因为细胞经过很长时间的培养有可能发生“漂移（**drift**）”，或者出现遗传（基因）或表型的改变。

延长体外培养hES细胞的代数可以选择出发生基因突变的细胞，这些细胞的自我更新（**self-renewal**）能力更强。在某些情况下，hES细胞在很长时间的体外培养过程中也可以保持在非常稳定的表型、核型以及印记状态。不过在另一些情况下，hES细胞会出现与人胚胎肿瘤细胞（**human embryonal carcinoma cells**）类似的异常核型，比如12号或17号染色体三倍体突变，或者出现其它类型的突变。最近，有两个科研小组发现hES细胞在长时间的体外培养过程中会频繁出现各种染色体异常（**chromosomal abnormalities**）情况，比如染色体20q11.21位点扩增现象，该突变与致癌性转化（**oncogenic transformation**）关系密切。通常而言，hES细胞即使在培养过程中发生了改变，甚至变得异常，但它们还是保留了多向分化潜能，同时也能表达标准的hES细胞标志物。虽然我们还不清楚hES细胞培养过程中出现的少数异常核型细胞是不是能够影响整个细胞群体的特性（比如生长速率、细胞周期调控能力、细胞分化能力等），但是由于这些异常细胞的存在，我们必须对干细胞产品进行严格的检测。如果能找到可以发现非整倍体细胞（**aneuploid cells**）的检测方法，那对于细胞产品的安全性检测来说将是一项重大突破。

对hES细胞表型稳定性的考虑源于制备这些细胞所采用的原始材料——人类胚胎。因为

用于治疗不孕症的体外培养胚胎一直以来都与表型紊乱（**epigenetic disorders**）现象相伴。有好几个科研团队通过分析hES细胞的X染色体失活（**X-inactivation**）状态、基因印记或甲基化状态等信息来对hES细胞的表型进行分析。研究发现，不同的hES细胞系它们X染色体失活的情况也不同，而印记研究则表明hES细胞在基因组水平上具有相当程度的稳定性。用于分析甲基化情况的检测新方法还处于研究之中，一旦找到了好方法，下一步就要对长期体外培养hES细胞的甲基化状态是否稳定进行仔细研究了。

我们对体外培养hES细胞的遗传以及表型改变如此关注不是没有原因的，这都与细胞产品的安全性息息相关。最重要的一点就是，对hES细胞及其分化细胞的检测必须是经过长期的检测才可以得出一个可靠的、准确的结论，只有这样才能对干细胞产品的稳定性下定论。因此，我们上述的用于检测产品均一性（比如细胞表型、核型、遗传及表型特征）的检验操作也都应该是在一个相当长的时间段里反复进行的。对细胞产品稳定性的检测应该包括某些关键基因（例如端粒酶、细胞周期相关基因、hES细胞特征性细胞标志物基因等）的表达水平，遗传稳定性以及表观稳定性，如甲基化情况、miRNA情况、组蛋白乙酰化情况以及X染色体失活情况等。将这些检测指标与体内稳定性检测结合起来，也许就能够找到一种能够检测遗传及表观特征标志物的体外细胞稳定性检测方法。

虽然我们认为用于最好的治疗的hES细胞应该是稳定的整倍体细胞（**euploid**），但请注意，FDA已经批准使用人胚胎肿瘤细胞系NT2细胞（该细胞是一种多潜能畸胎瘤干细胞）进行临床实验了。这些临床实验中使用的由美国加利福尼亚州桑尼维尔（**Sunnyvale, CA, USA**）Layton Bioscience公司制备的神经元细胞就是由NT2/D1细胞系分化而来。Layton Bioscience公司先将NT2/D1细胞系在维甲酸（**retinoic acid**）中诱导处理6周，然后再用有

丝分裂抑制剂混合物（antimitotic cocktail）处理6天，最后将获得的神经元细胞产品冷藏起来供移植使用。在进行移植治疗时，细胞经过解冻溶解处理后被注入中风患者体（脑）内。每名患者接受了200万至1000万个数量不等的细胞，在细胞植入后的第52周检测疗效。NT2细胞具有56至61条染色体以及众多的异常。不过单独的啮齿动物研究（separate rodent studies）表明，在手术14个月之后，植入裸鼠动物脑内的NT2N细胞（该细胞的处理方式与前述临床使用的完全相同）并没有表现出致癌性或者活跃的增殖能力，而且也没有肿瘤发生的情况。这些数据表明即使细胞具有不正常的核型或者是非整倍体细胞，也不代表就一定会致癌。

► 干细胞产品的致癌性

使用多潜能干细胞进行细胞治疗最重要的问题就是如何保证细胞植入后不会形成肿瘤（表11）。

表11 多潜能干细胞植入后会形成肿瘤的两个可能原因

- | |
|--------------------------------------|
| 一是细胞产品可能含有未分化的污染物细胞，这些细胞有可能会增殖形成畸胎瘤； |
| 二是细胞产品可能不稳定，会去分化或者发生转化形成良性或恶性肿瘤。 |

不过我们认为，对每一个患者个人来说，首先应该考虑的不是干细胞疗法的致癌性，而应该考虑风险收益比。如果该患者患有致命性的不治之症，比如肌萎缩性脊髓侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）或者亨廷顿氏舞蹈病（Huntington's disease），那么他们当然比能够有一个长期的，生活质量不错的患者诸如糖尿病患者等更应该接受干细胞疗法。

在评价干细胞疗法致癌性时应该考虑的几项因素。hES细胞的多向分化潜能可以用该细胞在免疫缺陷小鼠（immunocompromised mice）体内生成畸胎瘤的能力来评价。这种畸胎瘤是包含所有三个胚层的良性肿瘤。虽然hES细胞起源于胚胎内层细胞群（inner cell mass），但由hES细胞增殖而成的畸胎瘤在表型上却与由生殖细胞发育而来的畸胎瘤几乎一模一样。因此，我们也许能够借鉴生殖细胞肿瘤研究方面的大量成果来更好的了解、预测多潜能干细胞畸胎瘤的行为特征。

自发性畸胎瘤是生殖细胞来源肿瘤，它是一种良性肿瘤，包含有来自一个至多个胚层的各种细胞。这些肿瘤的行为特征依据起源和发病时期不同（青春期前还是青春期后）而各有差异。绝大多数卵巢畸胎瘤都是良性肿瘤，细胞内有46条染色体，核型为XX。这些畸胎瘤大多都是由各种不同细胞组成的，具有分化良好的囊性结构。而成熟的睾丸肿瘤（Mature testicular tumors）则通常都是细胞遗传学异常的实体瘤，情况复杂，可以被称作畸胎癌（teratocarcinomas）。睾丸畸胎癌一般都会表现出12号染色体短臂扩增，形成等臂染色体（isochromosome）i(12p)。不成熟的畸胎瘤通常都具有不成熟的神经上皮组织（neuroepithelium）。因此如果患者畸胎瘤（癌）里神经上皮组织越少，那么他们的存活率就越高。

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：陈小姐

上述这些生殖细胞肿瘤的特点表明，性别、核型稳定性以及干细胞在免疫缺陷小鼠体内形成的畸胎瘤的类型都可以提示我们，细胞产品的危险程度以及我们需要采取哪种级别的检测手段。尤其是干细胞形成的肿瘤类型，这在细胞疗法安全性检测中是非常重要的一项指标。如果某一hES细胞是稳定的整倍体细胞并且由它形成的畸胎瘤是分化良好的畸胎瘤，那么该hES细胞就要优于那些非整倍体的，只能形成不成熟的含有神经上皮组织的hES细胞。

检测生产原材料。在确定了hES细胞能够形成畸胎瘤之后，下一个问题就是需要多少hES细胞才能形成一个畸胎瘤，畸胎瘤的形成会受环境影响吗？

准确定量要形成畸胎瘤所必须达到的细胞剂量，这将是干细胞治疗时非常重要的一项安全指标，只有知道了这个标准，我们才能确保细胞产品没有致癌的风险。要形成一个畸胎瘤通常需要注入100万至1000万个hES细胞。不过形成畸胎瘤的效率也会依细胞植入位点的不同以及实验动物品系的不同而产生差异。而且，考虑到植入时存在细胞死亡等影响因素，这些都会降低致瘤细胞的有效剂量。最后一点，hES细胞在培养时非常稳定，那些解离下来的细胞都会死亡或者变成非整倍体细胞。不过有研究发现，如果加入能影响细胞间相互作用的ROCK抑制剂，那么hES细胞团解离成单个细胞后的存活率反而还会增加。因此要确定能形成畸胎瘤的hES细胞的绝对数量必须要了解hES细胞的组成情况（单个细胞还是细胞团）以及生存环境。

细胞植入位点也是非常重要的，有研究显示，在皮下植入NCL1细胞和在肝内植入NCL1细胞会得到生长率和分化程度完全不同的两种畸胎瘤。肝内畸胎瘤呈囊性，含有分化良好及分化不良的各种细胞，出现得更早，瘤体积也更大。相比之下皮下畸胎瘤出现得较晚，瘤体积也更小，瘤体内分化成熟的细胞更多。我

们还不清楚这种畸胎瘤上的差异是由于植入时NCL1细胞死亡率的差异造成的，还是因为细胞植入后的增殖速度、局部环境影响因素等因素造成的，或者是上述几种因素共同作用的结果。

Shih小组的研究成果证实了植入细胞所处的微环境同样具有重要作用。Shih小组将hES细胞与人胎儿胸腺组织（human fetal thymus tissues）、胰腺组织（human fetal pancreas tissues）和肺组织（human fetal lung tissues）一起进行移植实验。如果hES细胞与人胎儿胸腺组织共移植，就会形成含有原始的、未分化细胞而不是含有已分化细胞结构的成熟畸胎瘤。相反，如果将同样的hES细胞植入小鼠后肢中，则会形成分化良好的畸胎瘤。Shih小组还测定了在与人胎儿胸腺组织或肺组织共移植的情况下，能够形成畸胎瘤所需要的hES细胞数。结果发现植入5000个hES细胞就能够形成畸胎瘤，而如果只植入50个hES细胞肯定不能形成畸胎瘤。当然将人胎儿组织与hES细胞一起植入，这并不是临床上会采用的治疗方法。可能将hES细胞来源细胞与成年人组织共植入才是更为合理的实验方法。不过无论如何，上述这些研究成果都表明，hES细胞来源产品必须在相应的使用环境下进行相关检测。在真正的临床应用时，细胞所处的微环境往往都是病理状态下的微环境，也可能是处于免疫抑制状态下的微环境。因此我们建议，应该在包括治疗位点在内的多个位点植入细胞产品，来判断能够致瘤的需要植入细胞数。

检测细胞产品。到目前为止，用于体外检测hES细胞分化程度的检测方法都不是百分之百有效。因此，用于治疗的已分化细胞都是异质性的细胞群体，都可能含有未分化或低分化的污染物细胞。这就要求我们必须采取更为严格的检测措施，保证细胞产品没有致瘤性。主要考虑以下几个因素（表12）。

表12 影响细胞产品致瘤性的多个因素

细胞产品类型	细胞产品的纯度和成熟度	细胞产品的植入量
细胞产品的植入位点	具体的临床使用情况	所采用的动物模型

已经有几项研究证实，在动物试验中，hES来源细胞不会造成畸胎瘤形成。在心内、颅内和脊髓（spinal cord）植入各种hES来源的细胞，都没有发现畸胎瘤形成现象。不过这可能与使用的细胞纯度、细胞成熟度以及细胞植入位点有关。如果使用分化不完全的hES细胞，那么畸胎瘤的发病率就会升高。Kroon小组报道，植入了胰腺内胚层细胞（pancreatic endoderm）的动物模型中，有15%的动物体内形成了畸胎瘤。不过Kroon小组注意到，他们植入的胰腺内胚层细胞中可能掺杂有中胚层及外胚层细胞。因此，这就很难判断，形成的畸胎瘤到底是由于植入细胞中混有hES细胞造成的，还是由于混有来源于三个胚层的细胞造成的。另一项研究发现，在患有帕金森氏病的小鼠体内植入hES来源的多巴胺能神经元细胞后，会形成一个移植物团块，该移植物中由不断增殖、扩大的未分化神经上皮组织形成，这说明它可能具有致瘤性。不过Ravindran小组进行的另一项研究则表明，即使在手术1年之后，植入的hES来源神经祖细胞也不会造成畸胎瘤形成。不过Kroon小组和Ravindran小组使用的hES细胞系不同，细胞培养条件、分化操作过程以及植入颅内的位点也不同。

上述这些研究成果说明，hES细胞来源产品的致瘤性会根据所使用的hES系，细胞产品的纯度和成熟度，植入的细胞数量和植入位点等各个因素的不同而有所差异。因此我们需要对上述这些因素进行彻底的检测，以确保产品的安全性。而且，还要将具体的临床使用情况考虑在内。比如，有效治疗需要辅以暂时性甚

至是长期的免疫抑制疗法，这些免疫抑制疗法就有可能影响植入细胞的存活率或者影响宿主对植入细胞的反应性。

这些检测的目的都是为了判断细胞产品最终是否会致瘤。因此需要进行至少1年以上的长期的观察，具体的观察时间依需要治疗的患者人数和风险收益比来确定。检测的细胞数也应该根据实际可能的人体用量来确定。通常我们都认为，实际的人体用量应该是实验检测用量的十分之一。因此，如果给患者植入的是1000万个细胞，那么在动物模型实验检测时就应该采用1亿个细胞。不过如果实验用的细胞数达到了10亿甚至更多，那么这时可能就不太适合再用小型动物进行试验检测了，这时，应该采取其他的检测手段。

选择何种动物进行上述实验也是一个需要仔细考虑的问题。使用小鼠和大鼠的优势是有现成的免疫缺陷模型可以使用，劣势是这些动物的寿命一般都较短，只有12至18个月，通常都是到了老年后才会自发形成肿瘤。如果使用免疫功能正常的大型动物则需要辅以免疫抑制疗法，但免疫抑制的作用并不彻底，而且这种情况通常也都不适合用于长期研究。因此，如果不形成肿瘤也有可能是由于动物免疫机制作用的结果，或者是免疫抑制剂的毒性作用结果，而不能说明细胞产品是安全的。不过最终决定选择哪种动物进行试验还要视实验细胞数和临床目的而定。

最后，还需要进行生物分布试验（biodistribution），来检测植入的细胞是否在体内迁移到了其他位置。如果细胞发生了迁

移，就需要检查它所处的新环境是否会影响细胞的分化和稳定性。Laflamme小组进行了这方面的研究，他们将hES来源的心肌细胞植入大鼠心脏内，4周后，使用PCR检测人ALU序列的方法对实验大鼠进行了检测，结果只在心脏内发现了植入细胞，这说明细胞没有迁移。这种细胞迁移检测对于每一个细胞产品都非常重要。

▶ 细胞产品的毒性

虽然细胞的致瘤性是大家关心的主要问题，但是细胞产品的毒性和稳定性也是不容忽视的。应该检测细胞产品植入后对主要器官的急性和慢性毒性，对血液生化指标造成的影响，以及血细胞计数的影响也要对植入位点周围的组织和器官进行检查。比如，如果植入细胞能够分泌生长因子或神经递质，那么就可能会对周围的组织器官造成影响。虽然这类检测都是在正常动物体内进行的，但是在有些病理情况下，细胞产品的毒性会更容易显现出来，因此最好是在病理模型上进行毒理检测。另外，诸如免疫抑制疗法等辅助治疗方法也会参与到这类检测之中。

已分化细胞的功能稳定性也非常重要。如果治疗效果是由于植入细胞以一种受调控的状态分泌的细胞因子造成的，那么这种调控作用就必须是非常稳定的。比如，如果是用于糖尿病人的能分泌胰岛素的细胞，那么细胞对血糖的反应性就非常重要，而且这种反应性必须能稳定的一直保持下去，因为如果胰岛素分泌失控就会对患者造成严重的危害。

▶ 细胞产品的免疫原性

虽然早期的研究都认为，因为hES细胞不表达HLA II类分子，细胞上HLA I类分子的表达量也很低，所以hES细胞以及它们的衍生产品都是“免疫豁免的（immunoprivileged）”，即不具有免疫原性的。不过最近在免疫功能良好的啮齿动物试验中发现，hES细胞可以诱

发免疫排斥反应。我们现在已经非常明了，每一个hES细胞产品的免疫状态都需要仔细检测，在大多数情况下都需要辅以一定程度的免疫抑制疗法。于是就出现了问题，比如为了更少采用“比较猛烈的”免疫抑制疗法，是否需要进行器官移植手术时需要的那种HLA配型。要达到配型的要求就需要很多hES细胞系产品，初步估计至少需要数百种到上千种。即使我们能够生产出这么多的hES细胞系，后续的鉴定工作也非常麻烦。还有一种方法就是生产没有免疫原性的“移植细胞（transplanted cells）”，这个方法虽然听起来不错，但目前还没有实现。

是否采用免疫抑制疗法还受细胞移植位点的影响。如果移植到中枢神经系统等人体天然免疫豁免部位，那么就只需要辅以短暂的免疫抑制疗法。但是如果移植到外围部位那么就需要进行“全套的”免疫抑制处理。因此对每一个细胞产品的免疫状态进行检测时都应该在合适的移植位点进行。不过，如果使用iPS细胞将有望能解决免疫排斥问题，因为iPS细胞来源于患者本身的体细胞。现在对iPS细胞的研究还处于早期阶段，还有很多质量评价、控制工作需要完成。

▶ iPS细胞产品

将人体体细胞重编程为多潜能干细胞这一重大发现对于未来干细胞疗法的发展具有极其深远的影响。有了iPS细胞技术，我们就能很容易的获得患者特异性的干细胞，因此iPS细胞技术带给了我们很多机遇，但同时也存在很多挑战。与hES细胞类似，iPS细胞也具有很强的增殖能力和多向分化潜能。使用iPS细胞发展安全的细胞疗法也需要面对上述hES细胞所面临的问题，比如与重编程操作技术有关的几项问题，重编程程度问题，细胞组织来源问题，细胞产品批次差异性问题，供体间的差异问题等，只是不需要考虑免疫原性问题。

iPS细胞制备技术虽然发展很快，但还处

于初级阶段。最初，我们使用逆转录病毒或慢病毒载体将*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc62*、*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*、*LIN28*等基因转入细胞重编程体细胞。但是操作过程中使用的癌基因和病毒载体可能出现的潜在插入突变风险都让我们对该技术的安全性表示担心。而且，虽然在iPS细胞中这些转基因大部分都不表达，但是经过种系传递（germline transmission）之后，我们能观察到*c-Myc*等致癌基因的表达。为了尽量减少基因组整合的可能风险，后来我们又陆续使用了腺病毒载体、转染质粒、附加载体、*PiggyBac*转座子载体、*Cre*重组酶可切除病毒载体（*Cre-recombinase-excisable virus*）。最近，我们通过直接将*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*这四种可穿透细胞膜的重组蛋白直接转入细胞中进行重编程，得到了iPS细胞。尽管我们在iPS细胞制备技术上取得了一些进步，但是细胞的产量和均一性还很低。可能每一种重编程因子的量或者它们之间的比例对于成功制备iPS细胞更为关键。因为有好几个研究团体都报告，他们获得了不完全的重编程细胞，这些细胞都是由于重编程因子的量不够或者处理时间过短造成的。核克隆（nuclear cloning）时发生了不完全重编程会导致克隆动物死亡或出现严重异常，这可能是由于部分重编程iPS细胞不稳定，更容易形成不成熟畸胎瘤所致。因此，在评价iPS细胞产品安全性时需要仔细检测重编程的完全性。如果要将iPS细胞更进一步应用于临床，还需要保持iPS细胞产品的均一性，这完全取决于重编程操作过程的一致性和所使用的重编程因子量上面的稳定性。

虽然iPS细胞与hES细胞比较类似，但是到目前为止没有人报道，这些细胞能够长期（数年）繁殖。可是检测iPS细胞在长期培养状态下的稳定性是非常重要的安全性指标。评价iPS细胞产品表型和核型的稳定性是决定这些细胞是否适合用于临床治疗的关键性指标。而且由于上述不完全重编程细胞的存

在，我们还应该仔细评价iPS细胞产品的表观遗传学稳定性，如上述细胞稳定性一节中所述的那样。

还有一个问题是iPS细胞的组织来源问题。到目前为止，人iPS细胞都是来源于成纤维细胞（fibroblasts）、表皮角质细胞（keratinocytes）和血细胞前体细胞（blood progenitor cells）。选择用何种组织细胞制备iPS细胞，主要是出于组织获取途径的安全性和可重复性以及细胞重编程效率的考虑。有研究发现，使用小鼠肝细胞（hepatocytes）和人表皮角质细胞都可以只需要使用更少的重编程因子或更少的逆转录病毒载体，就能成功的获得重编程细胞。虽然我们目前还不能肯定用哪种组织制备iPS细胞是最好的，但是我们可以肯定使用不同的组织来制备iPS细胞是有差异的。

除了组织来源不同之外，供体来源不同也会造成影响。我们设想，制备个体特异性的细胞是在这名患者不同年龄、不同健康状态下采集他的组织细胞，这些原始材料的差异就会导致重编程细胞的差异以及最终是否能获得目标已分化细胞的差异。

虽然iPS细胞的出现为干细胞疗法带来了一个非常光明的未来，但还是存在很多问题需要去解决。只有解决了这些问题之后，才能将iPS细胞真正应用于临床。毫无疑问，我们对iPS细胞的不断研究会让iPS细胞疗法尽快成为现实。

► 结论

在我们写这篇文章的时候，我们看到，FDA和其他一些主管部门制定了一些非常重要的管理措施，来更好的帮助iPS细胞和hES细胞这种新兴的、独特的产品发展、壮大。由于现有科学技术手段的限制，我们建议应该采取严格、谨慎的态度来保证iPS细胞产品和hES细胞产品的质量均一性。只有尽一切可能保证细胞制备过程中的每一步都一样才能保证产

品的均一性。这就需要不断地对生产各步骤进行检查，而单单只检查最终产品是远远不够的。hES细胞种源细胞库的质量和稳定性同样需要进行检测。这些检测工作绝不是一些貌似多余的工作，也不是推迟了细胞疗法的临床应用，而是后续疗效检测和动物实验之前必须完成的前期验证工作。只有通过了检测的种源细胞库才能被用来生产后续的细胞产品。我们对细胞产品均一性和检测方法标准化如此关注，是因为hES细胞产品的致癌风险与细胞产品组成情况和植入位点息息相关。如果可能的话，最好是将细胞产品植入辅以免疫抑制疗法的疾病病理动物模型中进行检测。虽然本文主要是就hES细胞产品展开讨论，但这些问题同样适用于iPS细胞等其他多潜能干细胞。

对于任何一种干细胞产品的安全性检测都必须要考虑该疗法对每一位患者的风险收益比如何。干细胞疗法与其他疗法一样，不可能完全没有风险。我们的目标是保证卫生主管部门、患者和临床医生们都能根据各自的风险收益比做出最佳选择。

原文出处：

Melissa K Carpenter, Joyce Frey-Vasconcells & Mahendra S Rao.(2009) Developing safe therapies from human pluripotent stem cells. *nature biotechnology*,27(7):606-613.



六、 篇外阅读

► 2008，大鼠干细胞研究的一年 ◀

2008年《科学》（*Science*）杂志公开评选出的年度突破是重编程，这是一个始于2006年的干细胞的科学革命。在干细胞和发育生物学领域，伴随着一个真正令人兴奋的大鼠研究的成就，2008年划上了一个圆满的句号。这便是人类首次从大鼠囊胚分离可信的具有生殖潜能的胚胎干细胞（图15）。

这是非常重要的工作，因为大鼠是继小鼠之后第二个能够分离出具有生殖潜能的胚胎干细胞的物种。尽管其它物种，包括人类和猴，也有分离出胚胎干细胞样细胞的报告，但由于缺乏确定的全能性金标准——嵌合体证据，这些胚胎干细胞样细胞的全能性仍然是争论的主题。从伦理道德上说，通过嵌合体检测来证明人类胚胎干细胞的全能性是不可行的。另一方面，从伦理角度考虑，其它物种应该是适合用于嵌合体的制造的。接下来的问题似乎是，其它物种产生真正的多能性胚胎干细胞为什么需要花费如此长的时间？显然，对于大鼠，套用小鼠胚胎干细胞分离的同样技术，并不足以产生出大鼠胚胎干细胞。