

成人多能祖细胞的研究进程

范时洋 易先宏 薛向阳 潘 骏*

(温州市温州医学院附属第二医院骨科, 温州 325000)

摘要 成人多能祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPC)最初是从骨髓中分离出来的一种稀有的类似于胚胎外内皮细胞的细胞, 与骨髓基质干细胞相比, 其生物学性状更加稳定, 扩增120代不衰老, 分化能力更强, 因此受到越来越多的干细胞研究者的青睐。该文将就MAPC的发现、发展过程及前景作一综述。

关键词 成人多能祖细胞; 间充质干细胞; 骨髓

Multipotent Adult Progenitor Cells Research Progress

Fan Shiyang, Yi Xianhong, Xue Xiangyang, Pan Jun*

(Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract Multipotent adult progenitor cells (MAPC), initially separated from bone marrow, are rare and similar to the embryo endothelial cells. It has the stronger proliferation potentiality and amplification ability than bone marrow mesenchymal stem cells, so it can be continuously amplified for 120 generations without proliferation aging phenomenon. It is favored by the growing number of stem cell researchers. In this paper, we will review on the MAPC discovery and development process and prospects.

Key words multipotent adult progenitor cells; mesenchymal stem cells; bone marrow

引言

随着医学的发展, 人类治疗疾病的方法越来越多, 干细胞已成为治疗人类一些传统方法难以治愈的疾病(如某些先天性疾病、心血管疾病、神经功能退化性疾病、免疫排斥疾病、Crohn病等)的一种新技术。尽管干细胞规范化地大规模应用于临床尚需一段时间, 但已开始逐步从实验阶段向临床靠拢, 由于其独特的功效、生物安全性高等优点, 其应用前景被普遍看好。但是, 这些年来, 干细胞治疗疾病在临床上一直没有被广泛应用, 因为这种技术还不成熟, 还面临诸多问题。其中, 种子细胞的来源

一直是困扰干细胞研究者的难题之一。随着干细胞研究的不断深入, 技术条件的不断成熟, 研究领域不断扩大、深化, 人们自然会不断寻找更加理想、更有实践价值的干细胞种子细胞来源, 从最初的胚胎干细胞到组织特异性干细胞以及后来开发的诱导多能干细胞, 每一类型干细胞都有其自身优势, 在不同领域被不同程度地开发。在这里我们要重点介绍一种有极大应用前景的干细胞——成人多能祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPC)。它最初是从骨髓中分离出来的一种稀有的类似于胚胎外内皮细胞的细胞, 因其形态学稳定、分化能力强、扩增120代不衰老等优点受到越来越多的干细胞研究者的青睐。下文将就干细胞的研究进程作一简单介绍。

1 胚胎干细胞

对干细胞的研究, 最早的是胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC), 是科学家最初从3.5周的老鼠胚胎和4~5周的人胚胎中提取得到的一种具有极大分化

收稿日期: 2012-10-25 接受日期: 2012-12-03

浙江省科技厅(批准号: 2009C33131)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88002831, E-mail: panandjun@hotmail.com

Received: October 25, 2012 Accepted: December 3, 2012

This work was supported by the Science Technology Department of Zhejiang Province (Grant No.2009C33131)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88002831, E-mail: panandjun@hotmail.com

网络出版时间: 2013-03-04 16:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1604.008.html>

能力的细胞,取名为胚胎干细胞^[1]。它起源于胚胎内部的细胞团,除了不能分化成滋养层细胞外,能分化成身体所有的体细胞和生殖系细胞^[2]。ESC具有多种多能性基因表达,如*Oct4*、*Nanog*、*Ssea-3*等。尽管ESC具有强大的分化潜能并可从人身上分离出来,但其安全性不能得到保障,在体外易形成畸胎瘤^[3],更重要的是胚胎干细胞的研究受到伦理道德的制约,使人们不得不从其他组织入手,寻找更加理性的干细胞来源。

2 胚胎外干细胞

除胚胎组织外,干细胞同样存在于许多组织中,包括骨髓、造血系统、神经系统、胃肠道系统、内皮系统、肝脏等。与ESC相比,组织特异性干细胞自我更新能力、分化传代能力不如胚胎干细胞,不能像胚胎干细胞那样分化成机体所有的细胞类型,但是,它具有分化成机体大部分体细胞的能力,作为治疗单一系统疾病的种子细胞是完全可以的。并且其来源广、取材方便、不受伦理道德限制,现已成为干细胞研究的首选种子细胞。

2.1 造血干细胞

造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)是第一种被认识的组织特异性干细胞,也是目前研究得最为成熟的一种胚胎外干细胞。HSC最初是从骨髓中分离出来的^[4],后陆续有报道称,分别从外周血、脐带血中也分离出了造血干细胞,可分化为各种成熟血细胞且具有较强的自我更新能力。目前主要通过细胞表面标志物来分离纯化HSC^[5]。现在,自体或异基因造血干细胞移植治疗血液系统疾病、某些实体肿瘤、自身免疫性疾病和遗传性疾病已经取得了令人瞩目的成就。

2.2 间充质干细胞

早在1976年,Lalykina等^[6]把骨髓标本接种到含胎牛血清的培养体系中,发现一种纤维母样细胞并命名为骨髓基质干细胞或骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[7]。它形态学上像成纤维样细胞,可扩增十几代左右,具有分化成多层细胞的能力。后陆续有报道称,在人体其他组织中也发现了这种基质干细胞,取名为神经干细胞^[8-9]、胃肠道干细胞^[10]、表皮干细胞^[11],骨膜、骨骼肌、滑膜、胎盘、脂肪组织和脐带血等部位或组织中同样也存在这种类似成纤维母样细胞的间充质干细胞^[12]。由

于这种间充质干细胞在体内分布广泛,易于获得,并能在体外大量扩增,曾一度被认为是最有应用前景的干细胞。

2.3 成人多能祖细胞(MAPC)

随着研究的不断进行,基质干细胞生物性状不稳定、易分化等缺点逐渐暴露出来,成为困扰干细胞研究者的一大难题。2002年,美国明尼苏达州州立大学干细胞研究所的科学家们在骨髓基质干细胞中发现了一种新的干细胞亚型,称之为成人多能祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPC),它比传统的骨髓基质干细胞拥有更强的分化能力,在体外能分化成中胚层、外胚层、内胚层细胞。当把MAPC重新注入早期胚胎时,它几乎能产生机体的全部细胞类型,并可在体外大量扩增,它能实现扩增120代以上而不出现衰老,分化能力也不会随传代次数的增加而受到影响。另外,与MSC不同的是,MAPC在一定条件下可向造血细胞分化。目前,猜测它可能是比MSC更早的一种特定时期的细胞^[13]。当把MAPC输入一个没有被X射线照射过的动物体内时,MAPC可进入造血系统、肝脏、肺脏和胃肠道系统,并能在新环境中生长、增殖、分化成有功能的细胞,其分化的具体机制尚不清楚,可能是受特定的诱导条件决定的。

2.3.1 MAPC的组织来源 MAPC最初是由美国明尼苏达州州立大学干细胞研究所的Verfaillie小组在对小鼠、大鼠及人的骨髓进行提取并传代培养后分离出的一种多能干/祖细胞,在单个细胞水平证实其可向三个胚层的组织细胞分化,可传至80代以上而保持基本特性不变,因此被命名为成人多能祖细胞(MAPC)。起初,科学家猜测MAPC可能是在骨髓中存在的一类数量稀少的、接近胚胎干细胞的多能干细胞,具有多向分化潜能。后来,对它的进一步深入研究发现,在其它组织中也同样存在这种细胞。Jiang等^[14]不仅从骨髓、肌肉、脑等组织中分离出了MAPC,而且还证明了不同组织来源的MAPC分化能力相差不大,都能分化成造血干细胞、内皮细胞、神经元细胞、胃肠道细胞、肝脏细胞等。

2.3.2 MAPC的特征 MAPC约8~10 μm长,呈三角状长梭型,核大,胞浆比较稀少。Jiang等^[14]证明,MAPC可扩增超过120代而细胞形态几乎无改变,无明显衰老,分化能力无衰退。MAPC不表达CD34、

CD44、CD45、c-Kit和MHCI、MHCII, 表达低水平的FLK-1、Sca-1和Thy-1, 高水平的CD13和特殊时期抗原3(SSEA-3)。后有报道称, MAPC能表达心血管标志物(Nkx2.5、GATA4、MLC-2v、MLC-2a、ANP、cTnT、cTnI)及平滑肌细胞标志物(SMA、SM22a)等^[15]。MAPC表达转化因子如Gata 4、Gata 6、Sox 7及Sox 17等^[16], 这些转化因子同样在初期胚胎细胞内也有表达。通过RT-PCR验证MAPC能够表达*Oct-4*、*Rex-1*等多能性基因, 但不表达*Nanog*和*Sox2*基因, 这也是与胚胎干细胞的主要不同之处。分别在培养40代和102代时检测其端粒长度均为27 Kb, 证明MAPC端粒长度不会随着细胞传代而发生改变, 表明端粒酶活性稳定。目前对MAPC起源的猜测可能是胚胎干细胞分化初期的某一个特定时期的细胞。

2.3.3 MAPC的生长要求 目前已知的MAPC培养基的标准配方是: 低糖DMEM、MCDB-201、胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白、硒仕钠、地塞米松、抗坏血酸-3磷酸盐、亚油酸、谷氨酰胺、PDGF-BB、EGF、LIF等; 有一种猜测认为, MAPC是在PDGF-BB、EGF或其他某种因子的诱导下从原始胚胎细胞分化早期的某个细胞团中分化而来的。Roobrouck等^[17]通过改变MAPC和MSC的培养条件(MSC的培养基为10%血清)来检测它们各自的生物学特征, 结果发现, 培养在MSC培养条件下的MAPC又能够重新表达原本不表达的*CD140b* mRNA, 其可能机制是MSC培养基中缺乏PDGF-BB, 失去了与MAPC的PDGF受体的结合作用, 而后者又对*CD140b* mRNA的表达起抑制作用, 因此, 使得MAPC重获了*CD140b*的表达。MAPC不仅受培养条件的制约, 还受到生长密度的影响: 当MAPC在2 000/cm²高密度培养时, 传3-6代后细胞形态学开始发生改变, 细胞表面标志物CD44、MHCI开始表达, *Oct4*基因的表达水平及核蛋白水平均有所降低, 分化能力也有所下降, 几乎丧失了分化成内皮细胞、肝细胞、神经细胞的能力, 分化成其它组织细胞的能力也不如低密度培养组; 当把高密度培养的3-6代细胞再次更换成低密度培养[(100-500)/cm²]时, 在传20代后, MAPC细胞表面标志物没能恢复到原先低密度培养时的水平, *Oct4*也没能重新表达。低密度培养的MAPC传120代形态学一直稳定, 分化能力也不衰退。关于高密度培养MAPC导致其生物性状改变的机制目前还不明朗,

尚需进一步研究^[18]。

2.3.4 MAPC的分化能力 MAPC能分化成3个胚层, 即外胚层、内胚层和中胚层细胞。当把MAPC重新注入缺血的心肌中, MAPC可重新分化成心肌, 改善心肌功能, 改变缺血性状。Aranguren等^[19]通过将从小鼠中分离的MAPC重新注入缺血的心肌部位发现, MAPC可以分化成动脉及静脉内皮细胞, 并可分化成心肌细胞, 重建缺血坏死的心肌、恢复心肌功能。同样, 陆续有报道称, MAPC也可分化成造血干细胞、成骨细胞、软骨细胞、肝脏细胞、胃肠道上皮细胞、神经细胞等。但是, 目前MAPC分化成原始功能的神经原细胞和星状细胞的技术还不成熟^[20], 还需要在这方面做更深层次的研究。

2.3.5 MAPC与传统骨髓基质干细胞比较 目前, 对MAPC的研究还处在初期阶段, 关于其与MSC的区别还没有一个明确的划分标准, 存在几种猜想: 一种观点认为, MAPC是原始生殖细胞分化而来的某个时期细胞, 尽管它的形态学与MSC相似, 但是它是与MSC截然不同的细胞种群, 它的分化能力明显强于MSC, 它能分化成MSC不能分化成的造血干细胞; 另一种观点认为, MAPC是存在于MSC中的一个亚型, 只不过这种亚型数量太少, 与MSC的比例大约是1: (10⁷-10⁸)。但其扩增分化能力强、形态学稳定, 可扩增120代以上不分化。Reyes等^[21]通过密度梯度离心骨髓单核细胞, 然后在低血清浓度或无血清浓度条件下添加PDGF-BB、EGF刺激, 在这种培养条件下不断传代, 当传代超过40代以上时, 普通基质干细胞MSC基本全部衰老死亡, 而剩下的就是更稳定的MAPC。通过这种方法来分离并纯化MAPC, 最后检测*Oct-4*、*Rex-1*多能性基因的表达, 并检测是否能分化成造血干细胞等方式来验证获得的细胞确实是MAPC。

2.3.6 MAPC研究中亟待解决的问题 尽管目前从骨髓中分离MAPC及其体外培养技术已成熟, 但是, MAPC作为种子细胞的数量太少, 在骨髓中密度太低, 这也是目前研究MAPC最大的困难。通常要想分离出较纯的MAPC需传40代以上, 至少需要培养2个月, 这大大降低了MAPC纯化的效率。目前, 美国明尼苏达州州立大学的科学家们正在寻找一种MAPC特异性表面抗原^[20], 这样就能及早地从骨髓基质干细胞中分离出MAPC, 使其早得到纯化, 更好地扩增。这样就大大加快了它的纯化效率, 使人们容易尽早得到纯化的种子细胞。

3 前景展望

研究干细胞的目的就是为了临床应用, 传统的医疗技术对许多疾病束手无策, 如免疫缺陷性疾病、退化性疾病、某些心血管疾病等。采用全新的干细胞重建组织器官, 恢复其原有功能或改善其原有功能, 是治疗疾病的一种全新思路, 其效果显著, 又安全可靠。

但是, 目前干细胞大量使用于临床还存在许多问题, 干细胞研究还处于初期阶段, 干细胞研究类别五花八门, 缺乏统一规范的方法, 同时, 干细胞的种子来源问题还无法得到统一, 还没有一种种子细胞能得到所有人的认可。我们认为, MAPC具有成为干细胞研究的理想种子细胞来源的优势, 因为它取材方便, 不受伦理道德的限制, 且其形态学稳定、分化能力强、生物安全性高, 现已有研究证明MAPC注入严重联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency, SCID)小鼠体内不会形成畸胎瘤^[22]。MAPC经诱导后可向肌源性细胞转化, 注射到心肌梗死部位可以分化为心肌细胞, 重建心肌, 恢复心肌的泵血功能, 明显改善心功能等^[23]。虽然这些临床试验已取得令人满意的成绩, 但还存在诱导后细胞安全性、持久性是否可靠, 以及高龄或者接受过化学性、放射性治疗的供体用于治疗是否可行等问题, 要想在临床上规范化推广还需要做更多、更细致的工作。

参考文献 (References)

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8424-8.
- Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23): 8239-44.
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; 448(7150): 196-9.
- Spangrude GJ, Scollay R. A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1990; 18(8): 920-6.
- Lalykina KS, Latsinik NV, Epikhina Slu, Fridenshtein. Self-maintenance of induced bone tissue. *Biull Eksp Biol Med* 1976; 81(2): 239-42.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-4.
- Joseph NM, Mukouyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, *et al.* Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to schwann cells. *Development* 2004; 131(22): 5599-612.
- Zhang J, Duan X, Zhang H, Deng Z, Zhou Z, Wen N, *et al.* Isolation of neural crest-derived stem cells from rat embryonic mandibular processes. *Biol Cell* 2006; 98(10): 567-75.
- Brandl C, Florian C, Driemel O, Weber BH, Morszeck C. Identification of neural crest-derived stem cell-like cells from the corneal limbus of juvenile mice. *Exp Eye Res* 2009; 89(2): 209-17.
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, *et al.* Lgr5(ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 25-36.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-42.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-9.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30(8): 896-904.
- Dimomeletis I, Deindl E, Zaruba M, Groebner M, Zahler S, Lasso SM, *et al.* Assessment of human MAPCs for stem cell transplantation and cardiac regeneration after myocardial infarction in SCID mice. *Exp Hematol* 2010; 38(11): 1105-14.
- Lo Nigro A, Geraerts M, Notelaers T, Roobrouck VD, Muijtjens M, Eggermont K, *et al.* MAPC culture conditions support the derivation of cells with nascent hypoblast features from bone marrow and blastocysts. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(6): 423-6.
- Roobrouck VD, Clavel C, Jacobs SA, Ulloa-Montoya F, Crippa S, Sohni A, *et al.* Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells* 2011; 29(5): 871-82.
- Zeng L, Rahrmann E, Hu Q, Lund T, Sandquist L, Felten M, *et al.* Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2355-66.
- Aranguren XL, Luttun A, Clavel C, Moreno C, Abizanda G, Barajas MA, *et al.* *In vitro* and *in vivo* arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood* 2007; 109(6): 2634-42.
- Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Pauwelyn KA, Chase LG, Luttun A, Crabbe A, *et al.* Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol* 2007; 8(8): R163.
- Reyes M, Verfaillie CM. Verfaillie characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 231-3.
- Jahagirdar BN, Miller JS, Shet A, Verfaillie CM. Novel therapies for chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2001; 29(5): 543-56.
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, *et al.* Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 326-38.