

一种新型干细胞——侧群细胞

杨再峰 邵健忠* 项黎新 周庆军 张铭 陆永良¹ 姚行¹ 戴利成¹

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012; ¹湖州市中心医院, 湖州 313100)

摘要 侧群细胞(side population cell)是利用 Hoechst 染料和流式细胞术进行造血干/祖细胞分离时发现的一群特殊细胞, 广泛分布于多种成体组织、胚胎和某些肿瘤细胞系中; 它既具有类似干细胞的自我更新和多向分化潜能, 还具有独特的表型标记和生物学特征, 代表了一种新的干细胞类型。对侧群细胞的研究, 不仅有助于人们增加对干细胞增殖、分化及其发育调控机制的理解, 同时还提供了一种从不同组织中分离纯化和利用多能干干细胞的新策略, 为组织工程和细胞治疗提供新的干细胞材料来源。现就侧群细胞的组织分布、生物学特征、表型标记、信号转导机制及其与肿瘤发生相关性等方面的研究进展进行了综述, 并对侧群细胞的进一步研究和应用作了展望。

关键词 侧群细胞; 干细胞; 生物学特征; 表型标记; 信号转导

在干细胞表型标记和功能特性研究中, 人们发现造血干/祖细胞具有将荧光染料 Hoechst 33342 或 Rhodamin123 泵出细胞外的特性, 利用这一特性并结合荧光激活细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)可对其进行分离纯化, 这已成为一种常用的分离造血干/祖细胞的方法。在利用 Hoechst 染料进行造血干/祖细胞的 FACS 分析时, 常会发现一群分布特殊的细胞, 经过紫外激发后用双波长(450 nm 和 675 nm 以上波长)监测, 可以观察到这群细胞发出微弱的蓝色和红色荧光, 在流式二维分析点阵图上, 呈彗星状分布在造血干/祖细胞主群的一侧, 因此被称为侧群(side population, SP)细胞^[1]。近年来在成体多种组织、胚胎甚至肿瘤细胞中都发现了侧群细胞, 它们同源性高, 具有自我更新和多向分化潜能, 在体内能够分化产生不同组织类型的细胞, 因此很多学者认为其代表了一群新型的干细胞, 并将其称为侧群干细胞。随着对侧群细胞研究的不断深入, 人们对侧群细胞的分布、生物学特征、表型标记、信号转导机制及其与肿瘤发生的关系等方面的认识都取得了较大进展。

1 侧群细胞的组织分布

侧群细胞最初是在分离纯化小鼠骨髓造血干细胞时被分离和鉴定的^[2], 随后证实其广泛存在于人以及恒河猴、猪、小鼠、大鼠等多种动物的骨髓、胎肝、脐血、外周血等造血组织和血液中^[2-4]。近年来大量研究显示, 除了造血系统和血液外, 侧群细胞在人和动物的许多重要组织器官, 如肝、肺、

脾、肾、脑、神经、骨骼肌、心肌、睾丸、皮肤、胰腺、小肠、气管等均有广泛分布, 其功能除了参与造血系统的重建外, 还与相应组织的更新与再生、器官系统的自我重建以及成体干细胞的多器官可塑性有关^[5-12]。侧群细胞在不同成体组织中的含量不尽相同, 已有的实验数据显示, 骨髓中的侧群细胞占总骨髓细胞量的 0.05%, 占骨髓总有核细胞量的 0.79%; 而脾、肺组织中的侧群细胞含量较高, 分别占该两种组织中有核细胞的 0.96% 和 0.98%; 骨骼肌、肝、肾、心脏和小肠中侧群细胞比例更高, 可以达到 3.1%~9.1%; 而侧群细胞比例最高的是脑组织, 占了总有核细胞的 15.1%^[5]。

除在上述成体组织器官中检测到侧群细胞外, 近来在发育的胚胎以及长期稳定培养的肿瘤细胞系中也分离到侧群细胞。Nadin 等^[13]在怀孕 7.5~11.5 天小鼠胚胎组织中分离获得了侧群细胞, 并证实其在整个胚胎发育过程中表现不同的表型和功能特征。Setoguchi 等^[14]对几种癌细胞系检测后发现, C6 胶质瘤细胞、MCF-7 乳腺癌细胞、B104 神经母细胞瘤和 HeLa 细胞内含有 0.4%、2.0%、0.4% 和 1.2% 侧群细胞, 但在人骨肉瘤 U-2OS 和 SaOS-2 细胞内没有检测到, 表明并不是所有的肿瘤细胞系内都存在侧群细胞。Grichnik 等^[15]借助侧群细胞的分离鉴定方法, 对培养的黑色素瘤细胞进行了分析, 也得

收稿日期: 2004-08-05 接受日期: 2004-11-30

浙江省“十五”重大科技攻关计划资助项目(No. J20020579-30116)

* 通讯作者。Tel: 0571-88273287, E-mail: shaojz@zju.edu.cn

到了符合侧群细胞特征的细胞类群。

2 侧群细胞的生物学特征

侧群细胞作为一种主要来源于成体组织的特殊干细胞类型,与成体干细胞相比,既具有很多相似点,又具有其特殊的生物学性质,有学者认为其代表了发育过程中一群新的比成体干细胞更原始的干细胞类型。Benchaouir等^[16]在对侧群细胞的细胞周期研究中发现,多数侧群细胞是处于G₀期的静止细胞,用电镜观察侧群细胞的超微结构,可以发现细胞内大多是滑面内质网,缺少粗面内质网和核糖体,这些特征多与细胞的低代谢活性有关;进一步采用DNA芯片技术对侧群细胞的转录情况进行分析,发现侧群细胞的转录能力与主群细胞相比大幅降低,细胞内与细胞周期停滞相关的基因表达上调,而与细胞周期运行的相关基因表达下调,符合G₀期细胞的慢周期性特征。

根据侧群细胞泵出Hoechst染料特性,结合FACS方法可以对其进行分离富集,在此基础上,研究者利用一些特异性表面抗原标记或单克隆抗体对侧群细胞的异质性进行了研究。Storms等^[17]在研究人脐血侧群细胞时发现,它是一个以原始造血干/祖细胞为主,含少量定向分化细胞的混合体,从中分离到的Lin⁻侧群细胞中既含有大量CD34⁻细胞(88.3%±8.7%),也包含CD34⁺细胞(11.7%±8.7%);其中CD34⁺Lin⁻亚群含丰富的原始髓样祖细胞,而CD34⁻Lin⁻亚群则含一些成熟淋巴细胞;这两群细胞又可以根据更多不同的表面标记区分出更多亚群,在其中的CD7⁺CD34⁻Lin⁻亚群内发现存在早期的淋巴样祖细胞。Uchida等^[3]在其他造血组织的侧群细胞中也检测到了异质性特征。此外,造血系统外的侧群细胞也存在异质性,如对胰腺侧群细胞的研究显示,超过95%的人胰腺侧群细胞表现出CD45⁻,而其中又可以区分为94%的CD34⁻CD45⁻细胞和6%的CD34⁺CD45⁻细胞;取自猕猴的胰腺侧群细胞中70%表现CD45⁻,78%表现CD34⁻,超过70%表现CD34⁻CD45⁻^[18]。以上研究说明,侧群细胞是一类不均一的群体,由不同等级的干细胞亚群组成,各亚群之间的表面抗原标记和细胞类型等存在较大的差异。

侧群细胞具有多向分化潜能,在体外诱导下可以分化为多种组织细胞类型。最初的研究表明,来源于骨髓的侧群细胞具有很强的形成造血群落细胞的能力,并具有淋巴样和髓样造血重建活性;随后Preffer等^[4]用免疫缺陷小鼠进行了外周血侧群细胞造血群落重建实验,发现外周血侧群细胞也能分化为

淋巴样细胞和树突状细胞,显示其具有造血分化潜能。目前的研究显示,许多非造血组织来源的侧群细胞同样能有效地形成造血群体细胞,而且不同组织来源的侧群细胞可以跨越分化,如从小鼠骨骼肌中分离的侧群细胞能重建经射线破坏的小鼠骨髓^[19],而小鼠骨髓侧群细胞则能修复患有假肥大型肌营养不良症(DMD)的mdx小鼠^[20];另外,侧群细胞也具有分化成心肌细胞和内皮细胞的能力^[21]。近来在肿瘤研究中还发现,侧群细胞的分化与肿瘤的发生也有一定的联系,如Setoguchi等^[14]从C6神经胶质瘤细胞内分离到了侧群细胞,它们在体外一定的培养条件下,能分化形成神经元和神经胶质细胞,在裸鼠体内,则能在多种组织中形成肿瘤;Grichnik等^[15]分离鉴定了黑色素瘤内的侧群细胞,发现它们对维持黑色素瘤的生长和转移起关键作用。另外还有一些实验结果显示,侧群细胞可能是引起多种肿瘤恶变的原因。

3 侧群细胞的表型标记及其功能

侧群细胞是一类具有快速泵出Hoechst染料特性的细胞,近年的研究显示,这种特性与ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族成员ABCG2/Bcrp1(ATP-binding cassette superfamily G member 2/breast cancer resistance protein 1)的表达密切相关,提示ABCG2/Bcrp1可作为侧群细胞的表型标记而用于分离鉴定。ABC转运蛋白是一类以ATP为能量来源、运输多种物质的超蛋白质家族,与该家族的其他成员相比较,ABCG2/Bcrp1转运蛋白结构中缺少了位于两个跨膜区之间的连接区,是膜上的一种半转运子,其跨膜区与胞内底物如荧光染料偶联后,由ATP水解释放能量,使被偶联的底物跨膜转运出细胞^[22]。

ABCG2/Bcrp1转运蛋白最初是从人肿瘤细胞中分离的,其功能被认为是参与肿瘤细胞的多药抗性^[23],但长期以来有关其在正常生理状态下的功能并不完全清楚。Zhou等^[24]利用RT-PCR技术对侧群细胞表达何种转运蛋白进行了研究,结果发现不同组织来源的侧群细胞均表达ABCG2/Bcrp1,在此基础上,他们利用逆转录病毒载体进行了ABCG2和Bcrp1基因转染试验,探讨ABCG2/Bcrp1基因表达与侧群细胞表型特征的关系,结果证实了ABCG2/Bcrp1是侧群细胞转运Hoechst染料等表型特征所必需的。随后Uchida等^[25]应用基因剔除技术获得了Bcrp1基因缺失而多药耐药蛋白MDR1(multidrug-resistance transporter 1)正常表达的小鼠,发现在这种小鼠的骨髓和骨骼肌组织中,能够利用染料排斥

而进行分离鉴定的侧群细胞数量显著减少甚至缺失，由此认为是 ABCG2/Bcrp1 的表达而非 MDR1 直接决定了侧群细胞的表型特征。最近 Martin 等^[26]利用 RT-PCR、免疫组化和原位杂交等技术对胚胎发育期和成体心脏组织中的侧群细胞表型标记进行了研究，发现过度表达 ABCG2 的转基因生肌细胞 (C2C12) 出现了明显的快速泵出 Hoechst 染料特征，而用 ABCG2 特异性抑制剂 FTC 处理后这种特征消失，这进一步证实了 ABCG2/Bcrp1 是侧群细胞表型特征的决定因素。

ABCG2/Bcrp1 作为表型标记的确立对于侧群细胞和原始组织干细胞的分离鉴定具有重要意义。除了作为运输蛋白外，ABCG2/Bcrp1 还与侧群细胞的其他生物学功能相关，如在小鼠骨髓细胞中转染 ABCG2/Bcrp1 基因后，其侧群细胞数量显著增加，但造血重建功能却受到抑制，表明 ABCG2/Bcrp1 促进了侧群细胞增殖，而抑制了其分化^[24]。有人认为 ABCG2/Bcrp1 的这种调节作用与其作为一种膜运输蛋白能将分化诱导物质排出细胞有关，但也有学者认为是由于 ABCG2/Bcrp1 参与了调节侧群细胞与其微环境间的信号转导从而激活胞内相关的分化抑制信号通路所致。此外还有研究显示，ABCG2/Bcrp1 在调节造血系统发育以及保护干细胞免受异源性毒物的破坏、维持干细胞稳定等方面发挥重要作用^[27,28]。总之，对 ABCG2/Bcrp1 功能的深入研究，将有助于丰富侧群细胞和干细胞生长、分化和发育等方面的知识。

4 侧群细胞增殖和分化相关的信号转导机制

迄今，侧群细胞相关的信号转导机制研究表明，磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (PI3K)/Akt、受体酪氨酸激酶 2/血管生成素 1 (Tie2/Angiopoietin-1) 和 Wnt 等信号通路参与了侧群细胞的增殖和分化调控。PI3K 是细胞内一种重要的调控蛋白，具有脂酶及蛋白酶的双重活性；Akt 为原癌基因 c-akt 的表达产物，是 PI3K 直接的靶蛋白，它与磷脂酰肌醇的磷酸化产物结合形成复合物，激活下游通路。为了探讨 PI3K/Akt 在侧群细胞增殖中的作用，Mogi 等^[29]以 Akt1 基因缺失的裸鼠为模型开展了研究，发现 Akt 缺失的裸鼠，其骨髓中侧群细胞的数量与野生型相比显著减少，将组成型活化的 Akt1 基因转入野生型骨髓，则会引起侧群细胞的增加；而将组成型活化的 Akt1 基因导入 Bcrp1 缺失的裸鼠骨髓，则对侧群细胞的增殖没有影响，提示侧群细胞的增殖受 Akt 的调节，而 Akt 的调节又需要 Bcrp1 的存在。正常情

况下，利用荧光标记技术可以观察到 Bcrp1 定位于侧群细胞的质膜上，但用 PI3K 抑制剂处理野生型骨髓细胞后，Bcrp1 从质膜转移至细胞质中，同时侧群细胞发生迅速的可逆性减少。已知 PI3K/Akt 信号能控制胞内多种蛋白质的定位，并且能调节肝小管膜上 MDR1 和 MDR2 转运蛋白的活性^[30]，因此可以推测 PI3K/Akt 信号在侧群细胞内的调节作用至少有一部分是通过调节 ABCG2/Bcrp1 的定位来执行，侧群细胞增殖的可逆性下降很可能与 ABCG2/Bcrp1 从质膜转位至胞质内有关。此外 Arai 等^[31]最近证实，Tie2/Ang-1 信号也参与了侧群细胞增殖的调控，它对骨髓侧群细胞周期维持静止状态发挥重要作用；研究表明，骨髓侧群细胞表达的受体酪氨酸激酶 Tie2 能结合成骨细胞产生的 Ang-1，促使侧群细胞黏附至成骨细胞上，同时 Tie2 发生磷酸化修饰，并进一步活化 PI3K/Akt 信号通路，而 Akt 的活化又能使 CDK 抑制剂 p21 发生磷酸化而导致细胞周期阻滞^[32]。另有学者发现，Akt2 的过度表达会诱导 β 1 整联蛋白的上调，而整联蛋白又能通过其介导的信号通路调节细胞周期，所以 PI3K/Akt 信号通路也可能通过 β 1 整联蛋白调节侧群细胞的周期运行^[33]。

另有研究显示，Wnt 信号通路对于侧群细胞的增殖和分化也具有重要意义。在该研究方面，Liu 等^[34]曾把两种原代培养的小鼠乳腺侧群细胞与可溶性 Wnt 配体 Wnt3A 一起温育，发现侧群细胞增殖活性显著增强，但这种增强作用能被 Wnt 通路抑制剂所抑制，初步证实了 Wnt 信号在侧群细胞增殖中的作用。进一步研究表明，Wnt3A 能与侧群细胞膜上的跨膜受体结合，并通过一系列胞质蛋白的作用，使 β 连环蛋白和核内 T 细胞因子 (TCF) 激活，从而促进细胞增殖，抑制细胞分化，而这种调控作用一旦出现异常，就可能多种肿瘤的发生^[35]。此外，一些与应激通路相关的产物如热休克蛋白 70 和 105，DNA 修复蛋白 klf4 和 klf7，应激相关蛋白 Gstm1、Gstm3、Gstm5、Gpx3 和 Sod1 以及干细胞发育相关信号通路 Notch、TGF β -Smad 等也被认为涉及侧群细胞的信号转导^[26,36]。

5 小结和展望

虽然胚胎干细胞代表了最原始的全能干细胞，在组织工程和细胞治疗中具有广阔的应用前景，但其面临分化调控机制的复杂性和来源途径的伦理学争议，体内外深入研究受到限制；成体干细胞在成体组织中已经保留了发育过程中出现的完整干细胞谱，为干细胞发育机制研究提供了较为理想的模型，但成体干细胞的分化发育潜能已受到限制，而

且如何从复杂的组织细胞中分离各种含量极少的成体干细胞仍然是一个难点。侧群细胞作为干/祖细胞的一种特殊类型,其发育和分化状态可能介于胚胎和成体干细胞之间,因此仍具有很强的多向分化潜能和增殖特性;同时,由于侧群细胞广泛分布于各种组织器官中,含量丰富,又具有较明确的表型标记和分离纯化方法,所以较好地解决了其来源问题,这对推动干细胞理论研究与发展具有重要的意义,可在应用研究方面为组织工程和细胞治疗提供了新的干细胞材料来源,也为组织再生修复与原位重建提供了新思路。当然,目前对侧群细胞的研究与应用尚处于起步阶段,有关其发育地位、生物学性质与功能以及与肿瘤发生的关系等许多问题仍未有合理完善的结论,因此对侧群细胞还有待更多更深入的研究探索。

参考文献 (References)

- [1] Goodell MA *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 1337
- [2] Guo Y *et al.* *J Hematother Stem Cell Res*, 2003, **12**: 71
- [3] Uchida N *et al.* *J Clin Invest*, 2001, **108**: 1071
- [4] Preffer FI *et al.* *Stem Cells*, 2002, **20**: 417
- [5] Asakura A *et al.* *Exp Hematol*, 2002, **30**: 1339
- [6] Kim M *et al.* *J Neurosci*, 2003, **23**: 10703
- [7] Murayama A *et al.* *J Neurosci Res*, 2002, **69**: 837
- [8] Majka SM *et al.* *J Clin Invest*, 2003, **111**: 71
- [9] Falciatori I *et al.* *FASEB J*, 2004, **18**: 376
- [10] Watanabe K *et al.* *FEBS Lett*, 2004, **565**: 6
- [11] Lechner A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 670
- [12] Giangreco A *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286**: L624
- [13] Nadin BM *et al.* *Blood*, 2003, **102**: 2436
- [14] Setoguchi T *et al.* *Cell Cycle*, 2004, **3**: 414
- [15] Grichnik JM *et al.* *Pigment Cell Res*, 2004, **17**: 444
- [16] Benchaouir R *et al.* *Exp Cell Res*, 2004, **294**: 254
- [17] Storms RW *et al.* *Blood*, 2000, **96**: 2125
- [18] Poliakova L *et al.* *Transplant Proc*, 2004, **36**: 1166
- [19] Jackson KA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 14482
- [20] Gussoni E *et al.* *Nature*, 1999, **401**: 390
- [21] Jackson KA *et al.* *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1395
- [22] Rocchi E *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **271**: 42
- [23] Doyle LA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 15665
- [24] Zhou S *et al.* *Nat Med*, 2001, **7**: 1028
- [25] Uchida N *et al.* *Exp Hematol*, 2002, **30**: 862
- [26] Martin CM *et al.* *Dev Biol*, 2004, **265**: 262
- [27] Kim M *et al.* *Clin Cancer Res*, 2002, **8**: 22
- [28] Zhou S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12339
- [29] Mogi M *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 39068
- [30] Misra S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5814
- [31] Arai F *et al.* *Cell*, 2004, **118**: 149
- [32] Li Y *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 11352
- [33] Arboleda MJ *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 196
- [34] Liu BY *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 4158
- [35] Liu BY *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**: 9243
- [36] Ramalho-Santos M *et al.* *Science*, 2002, **298**: 597

Side Population Cell: A Novel Stem Cell

Zai-Feng Yang, Jian-Zhong Shao*, Li-Xin Xiang, Qing-Jun Zhou, Ming Zhang,

Yong-Liang Lu¹, Xing Yao¹, Li-Cheng Dai¹

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China; ¹Huzhou Central Hospital, Huzhou 313100, China)

Abstract Side population cell represent a rare fraction which is detected by dual-wavelength flow cytometry on the basis of the ability to efflux fluorescent Hoechst 33342 dye. They have been identified in hematopoietic compartments of mice, human, monkeys, swine and in nonhematopoietic tissues including skeletal muscle, brain, neuron, lung, pancreas and so on. More recently, they also have been found in some embryos and tumor cell lines. Side population cell, acting as a new type of stem cell for the activities such as self-renewal, unlimited proliferation and potential of differentiating into various cells, can be enriched for conserved phenotype molecular marker ABCG2/Bcrp1. Identification of the molecular marker will best facilitate the isolation and characterization of stem cell population. This important novel stem cell can be widely served as a material for research and application. Our review will focus on the distribution, biological characteristics, phenotype molecular marker, signal transduction mechanism of side population cell. The relationship between side population cell and the risk of tumor genesis will also be concerned.

Key words side population cell; stem cell; biological characteristic; phenotype marker; signal transduction

Received: August 5, 2004 Accepted: November 30, 2004

This work is supported by the Key Science and Technology Foundation of Zhejiang Province(No. J 20020579-30116)

* Corresponding author. Tel: 86-571-88273287; E-mail: shaojz@zju.edu.cn