

成体干细胞 Niche 与肺脏修复

史雪梅 张惠兰* 熊盛道

(华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸科, 卫生部重点呼吸病研究室, 武汉 430030)

摘要 肺脏是个开放的复杂器官, 覆盖其表面的上皮细胞持续暴露在病原微生物和大气污染物中, 最易受到损伤, 因而关于它的结构和功能修复问题一直是研究的热点。成体干细胞具有多向分化潜能, 在不同 niche 的作用下可以分化成不同的细胞。肺脏的不同区域含有不同的干细胞, 而且这些上皮干细胞在某些特定的条件下可以产生增殖和转分化, 因而这些不同水平的干细胞可以通过不同的修复方式来实现肺脏结构和功能的维持和修复, 但这些干细胞的来源及其在肺脏修复中的作用和机制并不十分清楚。因此对肺脏成体干细胞的研究进展进行综述以期对肺脏的修复有一个新的认识。

关键词 成体干细胞; niche; 肺脏修复

传统认为肺脏是一个极其复杂的器官, 自我更新或者再生能力非常有限, 但是随着干细胞生物学的发展, 现在认为它仍然存在再生和修复的能力^[1]。肺脏损伤后的这些修复和再生一部分是由定居肺内的细胞如 Clara 细胞和肺泡 II 型上皮细胞等通过原位增殖和表型改变来实现的^[2], 另一部分是通过来源于其他部位进入血液循环中的干细胞进入相应部位 (niche) 并定居而实现的^[3-5]。niche 是干细胞所在的微环境, 参与一些独特的胞外信号、细胞群体和基质间的相互作用, 是干细胞增殖、分化的基础。niche 不但能够保护这些干细胞, 同时还能决定这种修复的转归, 如肺脏良性再生可以使损伤修复, 但不良再生或修复则可以导致肺脏纤维化。从治疗的角度, 由于某些遗传性疾病如囊性纤维化和某些肺损伤, 其基因治疗必须有效的针对气道内干细胞及其 niche, 因此气道内干细胞的鉴定有利于对这些细胞进行靶向基因调控, 这些干细胞的正确鉴定和应用研究对肺脏修复及其分子医学的发展有重要意义。

1 成体干细胞及其 Niche

目前对成体干细胞的定义尚有争论, 但要具有集落形成, 自我更新和多向分化潜能等特性^[6]。干细胞通过三种状态来调节它的自我更新和分化, 即未分化状态、增殖状态和分化状态(图 1)。干细胞最终是处于何种状态取决于所处微环境里几种转录因子的表达。成体干细胞的分化有对称性分化和非对称性分化, 前者是自体细胞的分裂和更新, 后者一方面分

化为与自体相似的细胞, 另一方面能转变成为其他细胞的祖细胞。生理条件下, 这种转化非常慢, 但有些细胞终生可以作为细胞转化的来源^[7]。调节这种转分化的信号有外源性的(如生长因子, 细胞间质或其他胞外因素), 内源性的(如核转录因子) 或两者兼而有之。现在更多的把研究重点放在了干细胞所在的微环境, 即 niche^[8], 它属于细胞外基质, 当机体出现生长发育或者环境应急的情况时, niche 就是通过与其他细胞和细胞外基质组分相互作用来相应调控干细胞的所有活动以适应机体的需要。当干细胞到了新的 niche 中, 在新的微环境中信号的作用下, 它们将会发生一系列的再生和转分化。尽管这些信号的特性还不清楚, 但是来源于不同组织的干细胞如肌肉或者骨骼, 若给予相同的培养环境将会得到具有相似特性的细胞。其中比较重要的一种是 $\beta 1$ -整合素, 它为上皮干细胞所必需, 当干细胞因为凋亡或者转分化离开自己的 niche 后, $\beta 1$ -整合素可以将它“铆钉”在相应的位置。因此若干扰 niche 就可以改变干细胞的增殖和分化潜能^[9,10]。通常 niche 可以保护干细胞处于未分化状态, 以便在机体受损伤时发挥修复作用^[11]。

该分级模式由未分化细胞, 瞬时增殖祖细胞 (TA) 和成熟的有丝分裂后的分化细胞组成。niche 可能种细胞及相关分子, 还有保护它的血管和神经构

收稿日期: 2007-05-28 接受日期: 2007-07-24

国家自然科学基金项目(No.30500224, No.30400193)

* 通讯作者。Tel/Fax: 027-83662898, E-mail: huilanz_76@163.com

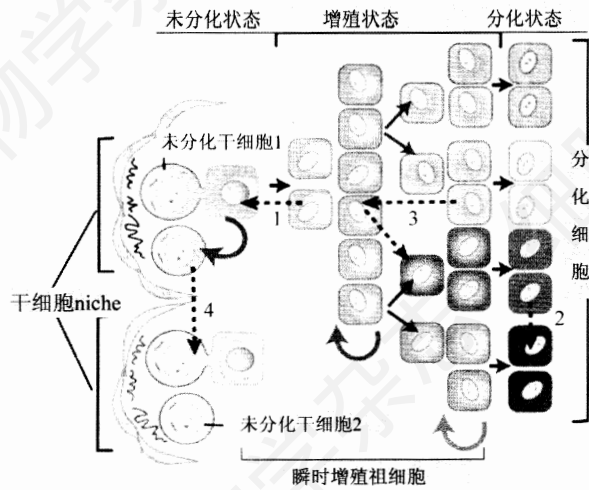
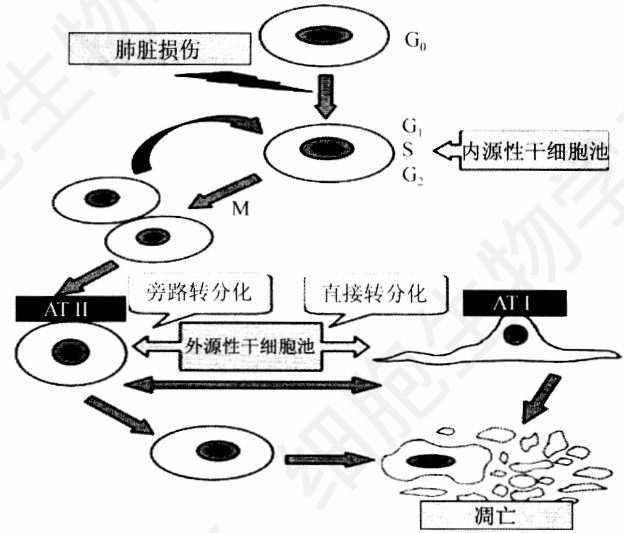
图1 经典的干细胞分级模式图^[12]图2 干细胞修复肺脏的方式和过程^[13]

表1 细胞转分化修复的方式

| 修复方式 | 修复特点 | 举例说明 |
|-------|-----------------------------------|----------------|
| 分化 | 具有分化潜能的细胞分化为结构和功能上都比较成熟特异性的细胞 | AT II 转变为 AT I |
| 去分化 | 在结构和功能上分化较成熟的细胞重新恢复具有分化或者转化的功能 | AT I 转变为 AT II |
| 转分化 | 具有组织特异性的多能干细胞分化为其他组织 | 骨髓干细胞转分化肺组织细胞 |
| 直接转分化 | 具有组织特异性的多能干细胞分化为其他结构和功能都很成熟的组织细胞 | 骨髓干细胞转分化为 AT I |
| 旁路转分化 | 具有组织特异性的多能干细胞分化为其他同样具有分化潜能的其他组织细胞 | 骨髓干细胞转变为 AT II |

成。干细胞在它的 niche 中处于未分化状态,自我更新不常见,它可以经过增殖状态进入分化状态(直箭头代表)。瞬时增殖祖细胞(TA 细胞)自我增殖比较快(曲线箭头表示)。早期的 TA 细胞在 niche 受损时可以替代干细胞(虚线箭头 1),不同的分化细胞之间可不经分裂直接发生转分化(虚线箭头 2),TA 细胞之间也可发生去分化(虚线箭头 3)。此外不同的未分化干细胞之间也可以发生转分化(虚线箭头 4)。

2 肺脏修复干细胞的来源和修复方式

成熟肺脏的不同区域由不同的上皮细胞覆盖,如气管和主支气管为假复层上皮细胞,近端气道为具有纤毛的分泌细胞,在它的基底层有神经内分泌细胞和基底层细胞。细支气管也为具有纤毛的分泌细胞,但包含没有纤毛的 Clara 细胞。肺泡上皮为复层鳞状上皮即肺泡 I 型上皮细胞(AT I)和立方上皮即肺泡 II 型上皮细胞(AT II)。另外还有一种神经内分泌细胞,约在妊娠 8 周出现,虽多见于发育中的肺脏且在其生长发育中发挥重要作用,但在成熟肺脏只散在分布约占上皮细胞的 1%,故又称为神经上皮小体。修复肺脏上皮的干细胞有肺内源性和肺外源性两种,

在其修复过程中有分化,去分化,转分化,直接转分化,旁路转分化等几种方式,以 AT II 为例加以描述(图 2 和表 1)。肺损伤时,途径之一是处于未分化状态的内源性干细胞如 AT II 进入增殖状态,进而转变为 AT I 修复损伤。途径之二是外源性干细胞如骨髓干细胞经过直接转分化为 AT I 修复肺脏,或者经过旁路转分化为 AT II,进而由 AT II 再转变为 AT I 修复肺脏。AT I 也可以发生去分化再转变为 AT II。AT II 和 AT I 都可以发生凋亡。

3 肺内源性干细胞

肺内是否有干细胞定居曾有争议,但肺内的某些细胞确实符合干细胞的标准。由于它们较难分离以及体外转化率极低,故其鉴定和特征描述进展得很慢。肺脏内干细胞的特性依其所在气管树的不同位置而有所不同。通过一些肺脏损伤模型的研究结果,曾经认为肺脏内的多能干细胞只存在于近端气道包括气管和支气管、终末和呼吸性细支气管^[14]以及肺泡等几个水平。如在近端气道(气管和支气管)基底层细胞是主要的增殖细胞,终末或者呼吸性细支气管,Clara 细胞在损伤的刺激下有很高的增殖率。AT II

可以产生子细胞并进而分化为 AT I, 可能是肺泡的干细胞, 但现在的研究还发现了除此之外的其他细胞, 有的不仅肺脏存在, 在身体的其他组织也有类似细胞发现, 因其在组织受到损伤后亦有增殖和转分化能力而被划属于干细胞。

3.1 近端气道水平干细胞

在近端的气管和支气管, 广泛认为基底细胞和黏液分泌细胞是干细胞^[15], 基底细胞和副基底细胞形成多能干细胞的储备池。基底细胞成三角形, 位于柱状上皮的下面, 它既能将上皮细胞牢牢固定在基底膜上, 又能聚集在损伤部位, 在组织形态上转化成表达纤毛细胞和杯状细胞的中间体。Boers 等^[16]在研究气管剥脱的模型中利用增殖因子标记发现, 表达角蛋白 14 的基底细胞可以产生出现在气管中的所有上皮细胞包括基底细胞、纤毛细胞、杯状细胞、颗粒分泌细胞等等, 因而表明它是肺内干细胞, 可以不对称转化为肺上皮细胞, 但不是终末细支气管细胞或者肺泡上皮细胞^[17]。

黏液细胞是目前尚有争议的一类细胞, 尽管 Borthwick 等^[18]通过气管剥脱实验发现腺体中溴脱氧尿苷延缓标记细胞(bromodeoxyuridine label-retaining cells), 能分化成具有高度增殖特性的细胞, 并最终转化成黏液纤毛上皮细胞, 但该细胞是干细胞的证据依然不充足。

3.2 终末和呼吸性细支气管水平干细胞

Clara 细胞发现于 1937 年, 被一直认为是自身和纤毛细胞的祖细胞。Reynolds 等^[19]也在特异启动子驱动 TK 基因模型中证实, 破坏的细支气管和肺泡上皮可以被 Clara 祖细胞修复, 并与 Boers^[14] 等的发现类似。最近证明只有它的一个亚型符合干细胞的特点。这个祖细胞亚型表达 Clara 细胞分泌蛋白(clara cell secretory protein, CCSP), 定位于神经上皮小体的分泌池和气管-肺泡连接处, 具有分化特性, 双表达 Clara 细胞和肺泡上皮细胞的标志, 对蔡不敏感, 受刺激后开始分化并对损伤的肺脏进行修复。它们是 Clara 细胞和 AT I、AT II 的前体。这些细胞通过流式分类属于 Sca-1/CD34 阳性细胞族并具有自我更新和分化特性, 故称为支气管肺泡干细胞^[20]。

肺神经内分泌细胞(pulmonary neuroendocrine cells, PNEC)一直不被看作是干细胞。但由于它分泌的调节因子(如胃泌素释放肽)与上皮细胞的再生调节关系密切^[21], 人们对这一观点产生争议, 最近在肺泡上皮细胞分化的转基因模型中, 利用 CCSP 启动子调

控 TK 基因的表达, 发现随着一过性的 CCSP 表达细胞的缺失, PNEC 细胞出现增殖, 但没有转化成上皮细胞^[19, 22], 此研究结果依然支持 PNEC 非干细胞的观点。

纤毛细胞曾被认为是终末细胞, 有研究发现它在蔡损伤的细支气管鼠模型中可以转分化, 故现认为它与 Clara 细胞和基底细胞层细胞一起参与了远端气道的修复过程^[23]。

3.3 肺泡水平干细胞

AT II 因为肺损伤时能增殖并使受损肺泡上皮修复, 在 50 年以前就被定为干细胞。Reddy 等^[24]和 Maeyama 等^[25]的研究表明体内的 AT II 型细胞可以依据在高氧刺激下对钙黏着蛋白的不同反应分为两个亚型, 一种亚型钙黏着蛋白呈阳性, 细胞端粒酶活性低表达、无增殖活性且会受损伤, 而另一种亚型是钙黏着蛋白呈阴性, 细胞端粒酶活性高表达, 具有较强的增殖活性且不受损伤, 因而只有其中一种符合干细胞的特性。但有趣的是体外培养的 AT II 型并没有显示它较强的增殖能力, 反倒会很快失去它们的立方上皮的形态和表面标志而变为扁平上皮并表达 AT I 型的特征。尽管体内的 AT I 型是终分化, 在体外培养从 AT II 型上皮转化而来的 AT I, 却发现它又能表达 AT II 的标志^[26]。

3.4 万能细胞(universal cell)

这类细胞体积小, 需氧量少, 首次在鼠和羊的肺内发现, 体外能分化成类肺样组织, 尤其是肺泡或细支气管区的肺组织, 被称为芽胞样细胞^[27], 目前类似这样的小细胞在全身都有发现, 体外可以转化为它们各自来源的组织细胞, 又称为万能细胞。平常这些细胞一直是休眠状态, 直到受到损伤或疾病等刺激才会增殖。

3.5 细胞角蛋白 19 表达细胞

这类细胞存在于多种组织, 最早发现于皮肤和肝脏, 具有高增殖潜能且表达细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19/K19)。肺脏内的某些细胞也能被 CK19 标记, 尽管它们的特性没有很好的明确, Broers 等^[14]曾报道在人类肺脏的发育过程中, 9 周和 25 周的气管和肺泡表达 CK7、CK8 和 CK19。最近发现乳腺中也含有这样的细胞, 在胶原凝胶剂的培养中, 可以表达 CK19 并形成类似肺泡的结构。

4 肺外源性干细胞

除定居肺脏的上皮干细胞外, 研究发现骨髓来源

的某些细胞通过血液循环亦可到达受损的肺脏,在特定的 niche 作用下执行肺脏修复的功能。

4.1 骨髓干细胞

成体骨髓干细胞分为两类,一类为造血干细胞,一类为间充质干细胞,它们具有多向分化潜能^[28]。有研究发现骨髓来源的干细胞移植到肺脏可以转分化成肺泡上皮细胞,这种过程并随损伤加重而增加^[29]。另有研究也在人类造血干细胞肺脏移植后发现一种肺泡上皮嵌合现象,但目前对移植到肺内的这些造血干细胞是真的发生了转分化还是只是原位融合尚存在争议。尽管现大多研究认为细胞融合发生的机率是很少的^[30],细胞转分化和细胞融合依然被认为是它们转变的两种机制。Krause 等^[3]的研究被认为是干细胞研究的里程碑,他们将雄鼠骨髓干细胞移植入雌鼠,在雌鼠体内发现了含有 Y 染色体的 AT II,虽然其中的具体机制并未完全阐明,却为骨髓干细胞可以修复肺脏提供了有利的证据。但是最近也有研究对骨髓来源的干细胞转化为肺泡上皮细胞提出相反的证据。如 Kotton 等^[31]用在 SPC 调控下表达 EGFP 报告基因的转基因小鼠的骨髓间充质干细胞移植致死量照射的小鼠,用荧光显微镜观察那些在光学显微镜下观察到的位置和形态都类似 AT II 的区域,使用重叠合法分析发现那些所谓的由 MSC 转化而来的 AT II 其实是由于内源性的 SPC 阳性细胞和 EGFP 阳性细胞的荧光信号的重叠的结果。Chang 等^[32]用表达 SPC-GFP 的转基因鼠的骨髓细胞移植入博来霉素所致肺损伤鼠后,在受体鼠中排除自体荧光细胞,死细胞和污染的血细胞,也没有发现重建肺泡上皮细胞的骨髓干细胞。这些不同的实验结果也许是由于不同实验者使用的实验个体和研究手段并不相同(如 Y 染色体 FISH, GFP 表达细胞,或 β -半乳糖苷表达细胞等等),加上方法本身的局限性导致的。但这也不仅提示有关此类研究仍需进一步深入,同时也从另一个侧面对要使用的研究方法及手段提出了更高的要求。如果可能的话,所有的实验结果应该均通过一个替代的方法加以证实。

4.2 SP 细胞

SP(side population)细胞,又称为旁路细胞,可被 Hoescht 33342 染色,因表达运输体蛋白 bcrp1,主动流出染料来对抗梯度浓度,通过流式细胞仪能与 Hoescht 33342 染色主体细胞分开而得名^[33]。SP 细胞最早从骨髓分出而曾认为具有造血干细胞活性,现确定它是非造血干细胞,且具有组织特异性,并已在

乳腺 肝脏,胰腺等一系列的组织中发现。在近端和远端肺组织中也分离出来带有气道上皮和间充质细胞特性的 SP 细胞^[34-36]。这些细胞的特性与骨髓中的 SP 细胞的特性有些不同,尽管还不清楚它们是在肺脏发育过程中产生还是终生从骨髓中得到更新,但现在依然被认为是骨髓来源的。SP 细胞分化潜能和修复肺脏机制仍待进一步确定。

5 展望

肺脏疾病的致病致残率很高,而器官移植又有很多局限性,因此通过成体干细胞的可塑性,诱导分化成受损伤的细胞来实现肺脏的修复和再生,将是一个新的策略^[37]。对于这众多来源的具有修复和再生肺脏潜能的成体干细胞,最为理想的是将这些细胞通过体内或体外扩增,使它在体内能向有利于肺脏修复的过程发展,但是这些上皮细胞有可能会转化为基质细胞,而导致纤维化,这是一个潜在的危险,毕竟肺部纤维化这一病理过程常常与许多肺部疾病的其他病理过程相伴随。无论是从动物实验还是临床标本研究,现在越来越多的结果表明干细胞在肺脏损伤后的修复或者再生过程中发挥重要的作用,但是也存在有争议甚至是相反的结果。毕竟这些数据大多是利用以免疫组化或者荧光标记为基础的方法得到的,再加上这些实验技术本身的局限性,使得这些实验结果并不完全一致。随着有关干细胞在肺脏修复中的作用机制的深入研究和进一步阐明,结合基因治疗的成体干细胞移植将在肺脏修复中大有可为。

参考文献(References)

- [1] Brown LM *et al. Respir Res*, 2001, **2**: 340
- [2] Otto WR. *J Pathol*, 2002, **197**: 527
- [3] Krause DS *et al. Cell*, 2001, **105**: 369
- [4] Grove JE *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, **27**: 645
- [5] Kotton DN *et al. Development*, 2001, **128**: 5181
- [6] Blau HM *et al. Cell*, 2001, **105**: 829
- [7] Fuchs E *et al. Cell*, 2000, **100**: 143
- [8] Spradling A *et al. Nature*, 2001, **414**: 98
- [9] Engelhardt JF. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 649
- [10] Borthwick DW *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 662
- [11] Nishimura EK *et al. Nature*, 2002, **416**: 854
- [12] Rawlins EL *et al. Development*, 2006, **133**: 2455
- [13] Yen CC *et al. Eur J Clin Invest*, 2006, **36**: 310
- [14] Boers JE *et al. Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**: 1585
- [15] Kotton DN *et al. Exp Hematol*, 2004, **32**: 340
- [16] Boers JE *et al. Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **157**: 2000
- [17] Hong KU *et al. Am J Pathol*, 2004, **164**: 577
- [18] Borthwick DW *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 662

- [19] Reynolds SD *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **278**: L1256
- [20] Kim CF *et al. Cell*, 2005, **121**: 823
- [21] Reynolds SD *et al. Am J Pathol*, 2000, **156**: 269
- [22] Hong KU *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 671
- [23] Park KS *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, **2**: 151
- [24] Reddy R *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286**: L658
- [25] Maeyama T *et al. Eur Respir J*, 2001, **17**: 180
- [26] Danto SI *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, **12**: 497
- [27] Vacanti MP *et al. J Cell Biochem*, 2001, **80**: 455
- [28] Rojas M *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, **33**: 145
- [29] Jiang Y *et al. Nature*, 2002, **418**: 41
- [30] Spees JL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2397
- [31] Kotton DN *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, **33**: 328
- [32] Chang JC *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, **33**: 335
- [33] Challen GA *et al. Stem Cell*, 2006, **24**: 3
- [34] Summer R *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **285**: L97
- [35] Giangreco A *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286**: L624
- [36] Summer R *et al. Am J Physiol*, 2004, **287**: L477
- [37] Lovell-Badge R. *Nature*, 2001, **414**: 88

Adult Stem Cell Niche and Lung Repair

Xue-Mei Shi, Hui-Lan Zhang*, Sheng-Dao Xiong

(Key Institute of Respiratory Disease of Ministry of Public Health, Department of Respiratory Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Lung is an opening complex organ, of which the epithelia is easily injured by pathogenic microorganism and atmospheric pollutants resulting from continuously exposure to them. So the topic about its repairment in structure and function is still a hot spot in research. Adult stem cells have multi-directional differentiation potency, which can differentiated into different cells within different niche. Different region of lung has different stem cells, which have proliferation and transdifferentiation under some conditioned situation. So the repairment of lung in structure and function can be achieved by these stem cells in different level and their own repairing method. Now some aspects of these stem cells about its source, its effect and mechanism in lung repair are still unclear, so this article reviews some related progresses in order to provide a new recognition of lung repair.

Key words adult stem cell; niche; lung repair

Received: May 28, 2007 Accepted: July 24, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500224, No.30400193)

*Corresponding author. Tel/Fax: 027-83662898, E-mail: huilanz_76@163.com