

间充质干细胞表达趋化因子及受体的 相关生物学功能

王 瑛 李宁丽*

(上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一群存在于骨髓间质和其他组织间质的干细胞, 表达 CD34 和 CD133。近来研究发现, 存在于骨髓的间充质干细胞除了能支持造血, 向骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞进行多向分化外, 其分泌的趋化因子及其相关受体在 MSCs 的信号转导、维持内环境的稳定、损伤修复、免疫调节、支持造血等功能中也发挥了关键性的作用。

关键词 间充质干细胞; 趋化因子; 造血干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种干细胞, 其来源广泛, 采集方法众多。人脐带血、早期妊娠时胎儿的肝脏、小鼠、大鼠、羊、狗、猪等都能作为细胞的供者。尽管如此, 骨髓采集仍是最为常用也是最为有效的获取 MSCs 的方法之一^[1]。骨髓的 MSCs 在骨髓微环境中只占骨髓有核细胞的 0.001%~0.01%, 是一种具有多向分化潜能的非造血干细胞, 是骨髓基质细胞的前体细胞。近年研究证实, MSCs 除了具有维持内环境的稳定, 促进体内造血重建功能外, 还能抑制淋巴细胞的免疫功能。这些功能的产生, 主要依赖于 MSCs 分泌的可溶性的细胞因子与 MSCs 间的直接接触。最近部分研究显示, 趋化因子及趋化因子受体也在 MSCs 发挥效应时扮演着重要角色。趋化因子是一类可诱导的, 分子质量为 7~10 kDa 的促炎细胞因子。迄今发现的趋化因子根据其 N 端半胱氨酸模体的不同将其分为 C、CC、CXC、CX3C 四个家族^[2]。本文主要对 MSCs 分泌的趋化因子, MSCs 表面表达的趋化因子受体的种类及其功能进行归纳和总结。

1 MSCs 分泌的趋化因子

近期, 部分研究在体外试验时检测到了 MSCs 分泌的趋化因子。Honzarenko 等^[3]发现, 当人骨髓来源的 MSCs 培养于无血清的特殊培养基时, 能有效分泌 CC 家族的趋化因子 CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL20 (MIP-3 α), CXC 亚族的 CXCL12 (SDF-1), CXCL8 (IL-8) 和 CX3C 亚族的 CX3CL1 (FLK 分形素)。Liu 等^[4]报道, 脐带血来源

的 MSCs 能自发地同时分泌 28 种细胞因子, 其中 7 种属于趋化因子。除了上述报道的 CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3 α), CXCL8 (IL-8) 外, 还包括 CXC 亚族的 CXCL1-3 (GRO), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL10 (IP-10)。另外他们还发现, 无论来源于脐带血还是骨髓, MSCs 分泌的 CXCL8 (IL-8) 和 CCL2 (MCP-1) 都显著高于其他的趋化因子。而当 Lisignoli 等^[5]将外源性 3D 透明质酸(HA)支架和人类 MSCs 共同温育时, 又在培养液中发现了趋化因子 CXCL13 (BCA-1)。至此, 目前报道的 MSCs 在未受刺激的条件能自发性分泌的趋化因子已经达到了 12 种。

最近, Croitoru-Lamoury 等^[6]在 MSCs 的体外培养中加入了各种细胞因子。他们发现, 部分细胞因子能有效地上调 MSCs 趋化因子的转录水平。当人的 MSCs 和 TNF- α 共培养 72 h 后, MSCs 表达的部分趋化因子有一定的上调。上调的趋化因子包括 CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP- α)、CCL4 (MIP-1 β)、CCL5 (RANTES)、CXCL8 (IL-8) 和 CXCL10 (IP-10)。当刺激的 TNF- α 由 INF- γ 代替时, 上调的趋化因子有 CCL2 (MCP-1)、CCL5 (RANTES)、CXCL8 (IL-8)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10) 和 CX3CL1 (FLK 分形素)。当这两种细胞因子联合作用时, 能对

收稿日期: 2007-11-12 接受日期: 2007-12-27

上海市教委医学免疫学重点学科项目(No.T0206)、国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.2005CB522705-3); 上海市科委重点项目(No.06JC14044)资助

* 通讯作者。Tel: 021-63846590-776665, Fax: 021-63846383, E-mail: ninglixiaoxue57@yahoo.com.cn

MSCs发挥协同效应,更大程度上上调趋化因子CCL3 (MIP- α)、CCL4 (MIP-1 β)、CCL5 (RANTES)、CXCL9 (MIG)和CX3CL1 (FLK 分形素)。

2 MSCs表达的趋化因子受体

趋化因子受体是属7次跨膜受体家族(STSR-F),含有7个跨膜片断^[7]。目前报道的表达于静止型MSCs表面的趋化因子受体主要集中于CC, CXC两个亚族的受体。前者主要有CCR1、CCR2、CCR5、CCR7~CCR9,后者主要包括CXCR1~CXCR6。不表达CCR3~CCR6。虽然不同来源的MSCs表达的趋化因子受体各有各的特征,但是可以肯定的是,当MSCs体外培养时,它们都是在第二代时开始表达趋化因子受体并随着传代的增加表达逐渐减少,至16代后可能衰减至检测范围的下限。其受体的下降可能和MSCs体外分化和自发性的凋亡有关^[1, 3, 5, 7-10]。近来发现,体外培养的MSCs在部分炎症因子的刺激下,所表达的趋化因子受体也会相应的发生变化。流式细胞仪检测发现,炎症性细胞因子例如TNF- α 和IFN- γ 能有效上调人MSCs表面表达的CXCR4和CCR3。IFN- β 作为另一个炎症性细胞因子能从基因水平上调CXCR4、CCR3和CCR8,并且该上调存在剂量依赖性^[6]。此外,Wynn等^[11]通过CXCR4 N端肽阻断的方法,发现MSCs胞内的CXCR4是以糖基化的形式存在的,并且该趋化因子受体在胞内的储藏量远大于部分常见的细胞因子。

3 MSCs表达趋化因子及其受体的生物学作用

Honczarenko等^[3]在人骨髓源MSCs的体外试验中发现, MSCs表达的趋化因子受体一旦和相应配体连接,便能有效地诱导细胞促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)和/或黏着斑激酶(FAK)的磷酸化,并能选择性地活化转录因子(STAT)的信号转导。其中, CXCL12 (SDF-1)能活化转录因子STAT-5, CCL5 (RANTES)能活化转录因子STAT-1,使其磷酸化。这些趋化因子相关的信号转导途径在细胞的生长、分化及迁移中起到关键性的作用。目前研究较多的主要有以下4个方面。

3.1 维持内环境的稳定

骨髓来源的MSCs由于位于骨髓腔,因此在个体发育的过程中为内环境的稳定起到了关键性的作用。骨髓源MSCs表达的多种趋化因子及其相关受

体能趋化骨髓腔中的淋巴细胞,使其均匀分布并游走至次级淋巴器官。骨髓是淋巴细胞分化成熟的场所之一。B220⁺CD19⁺NK1.1⁻CD43⁺HSA^{cof}的前B细胞在分化为祖B细胞的过程中必须先与骨髓中CXCL12 (SDF-1)表达细胞相互接触后才能迁移至远端的IL-7表达细胞,最终离开骨髓至脾脏。而B细胞的最后阶段浆细胞也是通过CXCL12 (SDF-1)从脾脏回到骨髓的。由于骨髓中除了MSCs以外,部分基质细胞也同样表达CXCL12,因此推测B淋巴细胞在骨髓中的分化成熟可能是两种细胞共同作用的结果^[12]。由于MSCs还表达CCR7、CCR9、CXCR4等趋化因子受体,因此Honczarenko等^[3]猜测其可能也参与了T细胞的分化成熟,但是其具体作用途径仍待进一步的研究。另有研究发现,骨髓源MSCs分泌的CXCL12 (SDF-1)能激发基质细胞纤维形成,有利于其在骨髓中的趋化游走,使其均匀分布^[13, 14]。体外实验发现,用一定浓度的CXCL12和CXCL13能显著的诱导骨关节炎中成骨细胞的增殖及I型胶原的表达,和骨关节炎的发病和疾病的进展有一定的相关性。骨髓源的MSCs有分泌CXCL12和CXCL13的能力,但由于其在骨髓微环境中只占骨髓有核细胞的0.001%~0.01%,因此推断其分泌的趋化因子在维持骨髓内各种细胞功能的同时并不足以致病^[15, 16]。

3.2 介导损伤修复

由于趋化因子和趋化因子受体的作用,使MSCs能够在体内进行定向的游走。因此近年出现了有关MSCs在损伤修复及其相关临床治疗的报道。CCR2和CXCR4分别是单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)和基质细胞来源的因子(SDF-1)的受体,表达于MSCs的表面。据文献报道,当脑组织或者心肌组织缺血时,损伤的组织能够高表达MCP-1和SDF-1,促进表达CCR2及CXCR4的骨髓MSCs迁移到损伤部位。并且,MCP-1分泌的浓度越大,骨髓MSCs迁移数量越多。因此在缺血的早期,移植的MSCs能靶向性的经血液循环归巢至损伤部位,有效的修复肌纤维母细胞并改造胶原基质,从而治疗缺血性心血管疾病^[8, 17-21]。另外发现, MSCs表面的CX3CR1能和CX3C亚族的FLK分形素结合,有助于MSCs迁徙至受损的舌下神经核,有效的修复损伤^[22]。

据报道, MSCs的细胞移植除了能有效治疗缺血性心血管疾病及神经损伤外,还能促进合并局部放射损伤创面的愈合。其促愈机制可能是由于植入的MSCs分泌的趋化因子IL-8联合IL-6、TNF- α 等细胞因子有效促进了伤口周围包括中性粒细胞、嗜碱

性粒细胞及 T 细胞在内的多种炎症细胞和修复细胞向创面移行、增殖、及早启动修复,增加了局部修复细胞的数量^[23]。

值得一提的是, Cristino 等^[24]最近体外研究发现,人 MSCs 联合透明质酸来源的组织工程材料,经过 TGF- β 刺激后能有效诱导软骨的形成,帮助损伤软骨的修复。该过程中, TGF- β 参与调控了 MSCs 内包括 CXCL8、CXCL13、CXCL12 的转录,使各自的蛋白质表达产生变化。TGF- β 使前二者上升促进 MSCs 的增殖,后者下降下调 MSCs 向其他组织的黏附和迁移的能力,使软骨的修复更为完全。

由此可见, MSCs 在多种趋化因子的作用下能有有效的启动损伤修复。这一过程除了有趋化因子及其受体的作用之外,还有补体 C3、I、II 型胶原等的参与^[25,26]。因此, MSCs 的趋化过程是一个多因素参与的过程。不但需要多种趋化因子及其受体的参与,更需要联合其他的细胞因子甚至是补体。

3.3 参与免疫调节

现已证实, MSCs 可通过直接接触或者分泌可溶性因子对 T 细胞免疫反应进行负向调节。但是其作用机制至今尚未发现涉及趋化因子及其相关受体^[27,28]。Corcione 等^[29]将人骨髓源的 MSCs 和正常人外周血 B 细胞共培养,发现当两者比例为 1:1 时, B 细胞的增殖被抑制于 G₀/G₁ 期,而且共培养的 B 细胞表面的 CXCR4、CXCR5 及 CCR7 显著性的下降。这 3 个分别是趋化因子 CXCL12、CXCL13 及 CCL19 的受体。现证实 CXCL12 能有效趋化未活化 B 细胞及记忆性 B 细胞,而后者 CCL19 能吸引记忆性 B 细胞到淋巴区。因此目前推测该作用机制可能和人骨髓源的 MSCs 分泌的相关趋化因子有关,但该假设仍需要动物模型进一步的探索证实。

3.4 促进造血

Avecilla 等^[30]以血小板缺陷及血小板受体缺陷小鼠为实验模型,发现 CXCL12 (SDF-1), 在成纤维母细胞生长因子 -4 (FGF-4) 共同参与的条件下,能通过 VCAM-1、VLA-4 作用于血管内 CXCR4⁺ 的巨核祖细胞,促进其与骨髓内皮细胞的黏附,诱导其成熟并释放血小板,促进造血。抗 CXCR4 的抗体能阻断该作用使血小板释放减少。而目前已经公认的巨核祖细胞激活因子,包括 IL-6、IL-11 等并未参与该正向调控过程。

另一方面, Frenette 等^[31]和 Delgado 等^[32]以 P 选择素和 E 选择素配体基因剔除小鼠为实验模型,发现 CXCL12 (SDF-1) 与造血干细胞表面的 CXCR4 结合

后致使包括弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 在内的多种蛋白水解酶降解,以加强造血干细胞向骨髓基质、基质细胞的黏附,促进造血。Koc 等^[33]以经过高剂量的化疗药物治疗后进展期的 32 例乳腺癌病人作为研究对象,发现将自体的 MSCs 培养之后和造血干细胞共同移植后能对机体的造血能力进行修复,并且该治疗方法没有副作用。

4 小结

MSCs 所介导的生物学功能是近年来干细胞研究的热点之一。目前已经证实 MSCs 来源的趋化因子及其受体对缺血组织的修复、促进骨髓造血等有着巨大的应用潜力,因此这类细胞在临床修复及再生领域中将具有十分广阔的应用前景。而在 MSCs 的免疫调节研究目前主要集中于对淋巴细胞的免疫抑制及其临床应用研究, MSCs 来源的趋化因子及其受体相关的机制研究刚刚起步,多数趋化因子的作用至今尚未明了,实验研究也主要停留在体外培养阶段,缺乏足够的体内实验及动物模型。相信随着趋化因子研究的进一步深入,其应用领域将会得到进一步拓展,为 MSCs 在临床应用研究中开拓更加广阔的空间,并具有深远的理论意义。

参考文献(References)

- [1] Dazzi F *et al. Blood Rev*, 2006, **20**: 161
- [2] Zlotnik A *et al. Immunity*, 2000, **12**: 121
- [3] Honczarenko M *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 1030
- [4] Liu CH *et al. Cytokine*, 2005, **32**: 270
- [5] Lisignoli G *et al. J Cell Physiol*, 2006, **207**: 364
- [6] Croitoru-Lamoury J *et al. J Interferon Cytokine Res*, 2007, **27**: 53
- [7] Kucia M *et al. Leukemia*, 2005, **19**: 1118
- [8] Gong X *et al. Cell Biol Int*, 2006, **30**: 466
- [9] Schenk S *et al. Stem Cells*, 2007, **25**: 245
- [10] Ringe J *et al. J Cell Biochem*, 2007, **101**: 135
- [11] Wynn RF *et al. Blood*, 2004, **104**: 2643
- [12] Tokoyoda K *et al. Immunity*, 2004, **20**: 707
- [13] Papayannopoulou T. *Blood*, 2004, **103**: 1580
- [14] Petit I *et al. Nat Immunol*, 2002, **3**: 687
- [15] Grassi F *et al. J Cell Physiol*, 2004, **199**: 244
- [16] Lisignoli G *et al. J Cell Physiol*, 2006, **206**: 78
- [17] Wang L *et al. Exp Hematol*, 2002, **30**: 831
- [18] Frangiannis NG *et al. Cardiovasc Res*, 2002, **53**: 31
- [19] Toma C *et al. Circulation*, 2002, **105**: 93
- [20] Shyu WC *et al. Front Biosci*, 2006, **11**: 899
- [21] Schenk S *et al. Stem Cells*, 2007, **25**: 245
- [22] Ji JF *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 415
- [23] 程天民等. *中华医学杂志*, 2002, **82**: 1
- [24] Cristino S *et al. Tissue Eng*, 2007, Epub ahead of print
- [25] Ratajczak MZ *et al. Exp Hematol*, 2006, **34**: 986

- [26] Schmal H *et al. Cytotherapy*, 2007, 9: 69
[27] Blanc K *et al. Lancet*, 2004, 363: 1439
[28] Tse WT *et al. Transplantation*, 2003, 75: 389
[29] Corcione A *et al. Blood*, 2006, 107: 367
[30] Avecilla ST *et al. Nat Med*, 2004, 10: 64
[31] Frenette PS *et al. Blood*, 2000, 96: 2460
[32] Delgado MB *et al. Eur J Immunol*, 2001, 31: 699
[33] Koc ON *et al. J Clin Oncol*, 2000, 18: 307

Biological Function of Chemokines and Chemokine Receptors from Mesenchymal Stem Cells

Ying Wang, Ning-Li Li*

(Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Shanghai 200025, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) are stem cells that exist in bone marrow interstitial or other matrix which can express CD34 and CD133. Bone-marrow derived MSCs not only have the ability of haematogenesis, differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, recent study reveals that the chemokines they secrete and MSCs-related receptors also play an important role in signal conduction, homeostasis, injury repair and immunity regulation.

Key words mesenchymal stem cells; chemokine; haemopoietic stem cell

Received: November 12, 2007 Accepted: December 27, 2007

This work was supported by the Shanghai Leading Academic Discipline Project (No.T0206), the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2005CB522705-3) and the Shanghai Municipal Science & Technology Commission (No.06JC14044)

*Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-776665, Fax: 86-21-63846383, E-mail: ninglixiaoxue57@yahoo.com.cn