

- 979.
- [10] Gallo, V., et al., 1991, *Glia*, **4**: 245–255.
- [11] Gaspary, H. L., 1998, *J Neurophysiol*, **80**: 270–281.
- [12] Bendahan, A., et al., 1993, *FEBS Lett*, **318**: 41–44.
- [13] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 59–69.
- [14] Hu, J. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 51–58.
- [15] Radian, R., 1990, *J Neurosci*, **10**: 1319–1330.
- [16] Borden, L. A., et al., 1995, *J Neurochem*, **64**: 977–984.
- [17] Takanaga, H., et al., 2001, *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**: 1232–1239.
- [18] Meldrum, B. S., et al., 1999, *Epilepsia*, **40** (suppl. 9): S2–S6.
- [19] Ma, Y. H., et al., 2001, *Cell Res*, **11**: 61–67.
- [20] Mantz, J., et al., 1995, *Anesthesiology*, **82**: 502–511.
- [21] Paul, B. B., 2002, *Int J Neuropsychopharmacol*, **5**: 159–179.
- [22] Ma, Y. H., et al., 2001, *Acta Pharmacol Sin*, **22**: 340–348.
- [23] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 303–310.
- [24] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 59–69.
- [25] Sato, K., et al., 1995, *FEBS Lett*, **375**: 99–102.
- [26] Beckman, M. L., et al., 1998, *J Membrane Biol*, **164**: 1–10.
- [27] Corey, J. L., et al., 1994, *J Biol Chem*, **269**: 14759–14767.
- [28] Law, R. M., et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**: 23986–23991.
- [29] Quick, M. W., et al., 1997, *J Neurosci*, **17**: 2967–2979.
- [30] Beckman, M. L., 1998, *J Neurosci*, **18**: 6103–6112.
- [31] Deken, S. L., 2000, *Nat Neurosci*, **3**: 998–1003.
- [32] Whitworth, T. L., 2001, *J Biol Chem*, **276**: 42932–42937.

成体干细胞及其可塑性的研究进展

郭虹 赵春华*

(中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

自从1998年第一次从内细胞团分离到人的胚胎干细胞,人们很快认识到胚胎干细胞在再生医学中的潜在应用价值。人们相信干细胞的研究将带来临床治疗各种疾病的革命。随着科学的进展,人们从胎儿和出生后个体的不同组织中分离到具有自我更新、多向分化潜能和增殖特性的细胞,并称之为成体干细胞(adult stem cells)。目前研究表明成体干细胞不仅对其所在的组织器官有重建和修复功能,而且成体干细胞突破性的进展在于其具有分化为其他组织细胞的可塑性(plasticity)特征,即不仅可以跨系分化,甚至还能够跨胚层分化。成体干细胞的可塑性现象引起了许多科研工作者的兴趣。本文主要介绍各组织器官成体干细胞及可塑性研究和目前存在的争议。

一、骨髓干细胞及其可塑性

骨髓内主要有两类干细胞群体,造血干细胞和间充质干细胞。两类干细胞的特征及功能已有许多文章,在这里主要介绍这两种干细胞的巨大分化潜能。另外最近研究表明成体骨髓中也具有血液血管干细胞(hemangioblast)特征的干细胞存在。

1. 造血干细胞和间充质干细胞的可塑性

(1) 骨骼肌 在体外可以将骨髓间充质干细胞诱导分化为肌细胞^[1]。当间充质干细胞移植到肌营养不良(mdx)小鼠肌肉中,发现出现肌营养不良蛋白阳性的纤维表达,而mdx小鼠肌肉是不表达此蛋白的,提示间充质干细胞可以向肌源方向分化并具有治疗肌肉疾病的潜能。进一步将高度纯化的造血干细胞移植到mdx小鼠,发现移植的细胞可以和肌营养不良蛋白阴性的纤维融合并表达此蛋白,但是阳性细胞的数目很低。为了避免宿主小鼠存在肌营养不良蛋白恢复表达所造成的假阳性,Ferrari应用mdx基因突变从而将野生型的肌营养不良蛋白用PT-PCR区别开来。然而,结果显示不管移植的骨髓细胞数目多少,只有1%的肌肉纤维表达肌营养不良蛋白,其认为骨髓移植不能纠正小鼠的肌营养不良,可能与骨髓含有的干细胞的数目非常低有关^[2]。

(2) 肝脏 Petersen首先发现卵圆细胞和肝脏细胞来自循环中骨髓细胞^[3],将雌性大鼠骨髓细

本文由国家攀登计划专项基金项目(95-专-10)和China Medical Board of NY INC(CMB):

Stem Cell Biology, Engineering (Grant # 01-748)基金资助。

*联系作者。E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn

胞移植放射线照射的雄性受体大鼠,后者肝脏在乙酰氨基苄作用下造成严重损伤并抑制肝细胞的增殖,从而激活卵圆细胞,9天后发现Y染色体阳性的卵圆细胞,并分化成肝细胞。由于肝脏卵圆细胞表达造血细胞的表型c-kit,flt-3,Thy-1和CD34,提示至少部分卵圆细胞起源于骨髓。进一步用肝脏移植模型,将MHC II/L21-6⁻的大鼠的肝脏移植到表达MHC II/L21-6大鼠体内后,移植的肝脏胆管上皮有L21-6⁺和L21-6⁻细胞存在,说明受体来源的细胞分化为肝脏胆管上皮细胞,提示起源于受体动员到循环中的骨髓细胞。另外,肝脏细胞来自骨髓也在造血干细胞移植的病人身上得到证实^[4]。以上都说明来自骨髓的干细胞可以分化为功能性的肝细胞。

(3) 心血管 最近研究表明骨髓间充质干细胞可以向心肌细胞分化,当体外间充质干细胞用5-氮胞苷处理后,有多个细胞核的肌管形成^[5]。将间充质干细胞移植到心肌损伤大鼠模型,发现心室的功能得到改善,移植的细胞表达心肌的表型。但是分化的细胞位于瘢痕的中心,不可能和宿主的心肌整合,也没有收缩的功能。如果将间充质干细胞注射到正常宿主的心脏,移植的细胞不仅分化为具有心肌细胞的表型提示组成收缩蛋白的肌节形成,并且嵌入到宿主的心肌形成闰盘^[6]。然而,植入到心肌的效率很低,是否参与心肌的功能还不明确。另外,不管移植的宿主是否正常,移植的间充质干细胞都可以向内皮细胞分化。

移植造血干细胞到受损的心肌模型的研究目前取得了一定的进展。Orlic将表达GFP的Lin⁻c-Kit⁺的造血干细胞注射到大面积的心肌梗塞的小鼠心肌的周围,9天后移植的细胞迁移到受损的心肌,并分化为心肌和血管细胞(内皮和平滑肌细胞)^[7]。Jacson从骨髓来源转基因Lac-Z的SP细胞群移植到致死量照射的野生型小鼠体内,后者小鼠进行冠状动脉接扎造成心肌梗塞。结果发现SP来源细胞的参与形成梗塞边缘的心肌和血管的形成,对损伤的心肌进行修复,尽管心肌的植入水平较低,心肌只有0.02%,血管为3%^[8]。

(4) 神经 Eglitis首先报道转染NeoR⁺基因标记的成体骨髓造血干细胞移植到受体小鼠,发现受体小鼠的大脑中有NeoR⁺基因标记的大胶质细胞和星形细胞。Mezey用Y染色体做标记的雄性小鼠的骨髓造血干细胞移植到PU.1基因突变的雌性受体裸鼠体内,结果在受体小鼠的脑组织中4.6%的细胞为Y染色体阳性的细胞,2.3%的Y染色体

阳性的细胞表达神经元标记的NeuN和神经元细胞特异性烯醇酶NSE。说明供体骨髓造血干细胞可以分化为神经元细胞^[9]。Brazelton将表达绿荧光蛋白的骨髓干细胞静脉注射到放射线照射过的受体鼠,发现被移植的细胞迁移到受体小鼠的中枢神经系统,分化为神经元和星形胶质细胞^[10]。最近证明分离的间充质干细胞不仅在体外可以分化为各种神经细胞,体内也能分化为各种神经细胞。

(5) 胃肠、肾、皮肤和肺 骨髓来源的干细胞除了能分化为肝细胞外,还可以向其他上皮细胞分化。Krause将分离的单个造血干细胞移植到致死量照射的受体小鼠体内,不仅可以重建造血,也可以分化为肝、肺、胃肠道和皮肤的上皮细胞^[11]。另外,将转基因的Rosa-26小鼠LacZ标记的骨髓基质细胞通过尾静脉注射到野生型小鼠体内,后者用博来霉素造成肺损伤。结果发现肺脏的I型细胞既表达受体I型细胞特有表型LE lectin(*Lycopersicon esculentum*),X-gal也阳性。体外培养的骨髓基质细胞也表达I型肺泡的表型Tl α 和aquaporin-5,提示骨髓基质细胞可以分化为肺脏损伤的肺泡I型细胞^[12]。Imasawa移植骨髓来源的干细胞,发现在肾小球和肾小管有供者细胞分布。而骨髓来源的干细胞还可以分化为肾脏的血管系膜细胞。在肾脏移植的病人中,有一些受体来源的小管上皮表型的细胞^[13]。以上说明骨髓来源的干细胞可以向上皮细胞分化。

2. 血液血管干细胞(hemangioblast)

胚胎发育过程中,血液和血管的发育密切相关,胚胎外的卵黄囊和胚胎内的侧动脉脏层/主动脉性腺中肾区含有内皮和造血细胞的共同祖细胞称之为血液血管干细胞。目前的研究表明成体骨髓内也具有血液血管干细胞特征和功能的细胞存在。Grant等将转染绿荧光蛋白基因小鼠骨髓造血干细胞(Sca-1⁺c-kit⁺Lin⁻)移植到放射线照射的受体鼠,可以使受体重建造血,从受体鼠富集的造血干细胞再一次移植到致死量照射的宿主并诱导成视网膜缺血模型,20只受体只有3只重建造血,并且所有的三只小鼠的造血干细胞都能分化为内皮细胞并参与新的血管形成,提示Sca-1⁺c-kit⁺Lin⁻造血干细胞具有血液血管干细胞的特性^[14]。另一篇发表在2002年11月的Blood杂志Pelosi E从脐带血和骨髓分离到的CD34⁺KDR⁺的细胞可以产生大的含有造血和内皮细胞(Hem-End)的集落。而CD34⁺KDR⁻的细胞却不能形成。进一步将分离到的细胞

极限稀释后,仍能产生这种混合的集落,说明产生的混合集落是克隆源性的,提示此 $CD34^+ KDR^+$ 细胞具有双潜能的血液血管干细胞的特性^[15]。

而我们实验室也在2002年初从胎儿骨髓分离到 $Flkl^+ CD31^- CD34^-$ 的细胞,将来自单个集落的 $Flkl^+ CD31^- CD34^-$ 的细胞接种在含有 VEGF 和 bFGF 的基底膜胶中不仅可以形成血管结构,同时还产生造血细胞样的 $CD34^+$ 的圆形细胞。若将 $Flkl^+ CD31^- CD34^-$ 接种在含造血因子的半固体培养基中,能够产生原始红系细胞。在血管结构还未形成时加入抗血管形成剂苏拉明,不能形成血管,若在血管结构刚刚形成时,加入苏拉明,血管结构消失,而圆形细胞还在原来的血管周围,此结果提示圆形 $CD34^+$ 细胞和血管内皮来自同一细胞,说明 $Flkl^+ CD31^- CD34^-$ 具有血液血管干细胞的特征^[16]。

综上所述,骨髓中含有造血干细胞、间充质干细胞和最近研究的血液血管干细胞,其中前两者分化潜能是非常大的,不仅可以分化为造血细胞,还可以分化为其他多种组织的细胞。又由于骨髓干细胞相对来讲取材方便,所以从骨髓分离培养成体干细胞将会对自体移植治疗骨髓外组织的损伤提供了新的思路。

二、神经干细胞及其可塑性

过去人们一致认为成体哺乳动物中枢神经系统损伤后不再具有修复功能,然而人们逐步发现并认同在成体中枢神经系统存在神经发生,产生新的神经元,此功能可持续发生在成体的整个生命过程。具有此功能的区域主要在成体的海马,侧脑室下区。神经发生在健康成体内主要功能可能与哺乳动物的行为、学习和记忆有关。目前的研究发现凋亡、中风及缺氧等损伤也伴随有内源性的神经发生。成体的神经发生被认为是源于存留在成体中枢神经系统神经干细胞的增殖与分化。神经干细胞在中枢神经系统分布还存在争议,虽然在侧脑室下区及海马的齿状回有神经发生的功能,最近的研究表明神经干细胞仅仅存在于室管膜下区的室管膜细胞是神经干细胞。而 Seaberg 证实,海马的齿状回仅有定向分化为神经元或神经胶质的祖细胞,而真正的干细胞是出现在嗅球部位^[17]。

但是内源性的神经发生或神经干细胞群体,不足以替代神经组织的损伤。多项研究表明,移植到大鼠或灵长类的神经干细胞,能够存活、迁移,并在不同区域进行特异性分化,也能改善某些中枢神经

损伤动物模型(包括帕金森氏综合症和唐纳氏综合症)的症状。但目前仅停留在行为改善的水平,而对中枢神经系统的生理功能改善的证据还相当少,除了证明分化为具有神经元的表型外,仅有一个研究小组证明分化的神经细胞有突触的发生。

神经干细胞可塑性的潜能最早是 Clarke 将神经干细胞注射到鸡胚中和小鼠胚胎中产生的嵌合体的研究,并证明有各胚层细胞来源于神经干细胞:包括肝、胃、小肠、心脏、肌肉、中期肾、脊索等分化细胞。从成体小鼠大脑中分离出的神经干细胞在体外与拟胚体(embryoid body)共培养,发现神经干细胞表达骨骼肌细胞的表型。另外,将分离纯化的神经干细胞与肌细胞系共培养,荧光标记的神经干细胞分化为表达 myosin 的梭形肌细胞,有的还形成多核肌管。说明神经干细胞可以分化为肌肉细胞^[18]。有3个独立的研究小组报道神经干细胞向造血细胞分化。最早发现小鼠单个大脑细胞含有多能造血干细胞,能在放射线照射的宿主脾脏形成造血集落。Bjornson 分离转基因 Lac-Z 的 ROSA26 小鼠克隆源性的神经干细胞经尾静脉注射到亚致死量照射过的 Balb/c 小鼠体内,体外分离受体骨髓造血细胞,发现有神经干细胞来源的造血细胞,包括粒系和淋巴系细胞以及早期的造血细胞。Shih 从人胎儿大脑分离到的神经干细胞,输注到 SCID 小鼠的人重建造血模型中,发现人来源的神经干细胞也能向造血细胞分化^[19]。

三、胰腺干细胞和肝脏干细胞及其可塑性

胰腺在胚胎发育中,所有的胰腺细胞由导管上皮分化产生的。出生后正常发育个体,在生命的大部分时期持续生成新的小胰岛,而胰腺 β 细胞也持续扩增。在 I 型糖尿病、严重肝脏疾病、胰腺部分切除后,都发现有胰腺的新生,提示胰腺内可能含有干细胞。由于导管上皮具有分化为胰腺所有细胞的潜能,所以胰腺导管上皮是寻找胰腺干祖细胞最合理的部位。最近研究表明,PDX-1 表达阳性的导管上皮细胞可能是胰腺干细胞,可以产生所有三种类型的胰腺组织细胞^[20]。从大鼠和人的胰岛分离的 Nestin⁺ 细胞体外培养可表达肝、胰腺内分泌和外分泌基因,提示此类细胞具有多能性。最近的研究表明从胰岛分离的 Nestin⁺ 的细胞含有 SP(side population)细胞亚群,进一步证实了其具有多能干细胞

的特征^[21]。随着胰岛体内移植治疗 I 型糖尿病的成功,对可用的胰岛的需求也越来越多。所以对胰腺干细胞的研究显得尤为重要。

当肝细胞受到损伤或肝部分切除以后,哺乳动物的成体肝脏具有强大的修复功能。这主要依靠肝脏本身固有的两种干细胞维持,即功能性的干细胞和潜在干细胞(potential stem cells)。前者实质上是具有很高增殖潜能的肝细胞,当肝脏细胞因损伤而丢失时,肝细胞快速从 G0 进入 G1 期,来维持肝脏细胞数目。如果肝脏受到严重损伤,分布在肝内胆管树最小分支小叶间胆管和 Hering 胆道的潜在干细胞(即卵圆细胞)被激活,首先在肝细胞周围扩增胆管细胞并形成分枝状的胆管,然后分化为肝脏细胞。卵圆细胞的数目随着肝脏疾病的严重程度而增加。由于可以向胆管细胞和肝脏细胞分化,因此肝脏卵圆细胞被认为是具有双向分化潜能的干细胞^[22]。

胰腺和肝脏在胚胎发育过程中原本有共同起源,而两者成体干细胞的可塑性关系密切。Yang^[23]通过流式细胞仪分离到的 Thy-1.1 阳性细胞卵圆细胞,在高糖的环境诱导下,形成三维胰岛细胞簇并表达胰岛细胞分化相关标记和内分泌激素,在葡萄糖的刺激下合成并分泌胰岛素,同时丢失肝细胞蛋白 Hep-par 的表达。说明肝卵圆细胞可以分化为具有内分泌功能的胰腺细胞,提示其具有多能干细胞的特性。另外,当无铜饮食 8 周的大鼠完全导致腺泡萎缩后,加铜饮食,发现残留的胰腺导管出现具有肝细胞特征的细胞。而继续无铜饮食,腺泡萎缩外,还有非常类似于肝脏卵圆细胞的细胞增殖,将此卵圆细胞移植到肝脏,其可以分化为肝细胞并显示肝细胞的多种特征。说明胰腺内含有肝脏卵圆细胞或胰腺干细胞能分化为卵圆细胞。进一步的研究表明胰腺干细胞可以重建因延胡索酰乙酰乙酸酶缺陷引起的衰竭肝脏,有趣的是移植的细胞并非来自胰腺导管^[24]。

四、皮肤干细胞及其可塑性

哺乳动物的皮肤至少有 3 种具有分化功能的表皮成分:表皮、毛囊和相关腺体。表皮和皮脂腺是持续增殖的,而毛囊增殖是周期性的。研究表明毛囊角质细胞可以重建毛囊间的表皮,而将毛囊间的表皮移植进空的毛囊后,可以分化形成正常的毛发。目前认为表皮干细胞群体位于与竖毛肌连接的毛囊膨区,皮脂腺含有长期存活的干细胞。纤维切割获

得毛囊膨区细胞也可以形成角质细胞集落。表皮、毛囊和皮脂腺都含有各自的干细胞,还是皮肤内含有多能干细胞可以在不同的环境下分化为不同类型细胞,目前还不明确^[25]。

非常有意义的是目前的研究表明皮肤内具有多系分化潜能干细胞。Toma 从真皮分离到来自单个克隆的细胞体外可以分化为神经元、神经胶质细胞、平滑肌和脂肪细胞。分离真皮中成纤维样细胞,体外诱导和体内移植实验都证明能向骨骼肌分化。Liang 将绿荧光蛋白标记(eGFP)的表皮干细胞注射到小鼠的囊胚,结果发现 eGFP 阳性的细胞出现在发育的胚胎和成体小鼠的表皮、椎骨、肝脏和大脑。Lako 将毛囊球部真皮乳头和真皮鞘的细胞移植到致死量照射的受体小鼠体内,发现多系骨髓造血重建集落细胞 70% 来自供者的毛囊细胞。而毛囊的上皮细胞却不能重建造血^[26],表明皮肤内含有具有重建造血功能的干细胞位于毛囊球部真皮乳头和真皮鞘。

五、骨骼肌干细胞及其可塑性

肌肉组织存在着卫星细胞,位于成熟的多核肌纤维的周围,肌膜外基层内。卫星细胞在成体肌肉内静息,当肌肉损伤时被激活。移植放射标记的卫星细胞,可以使受体肌肉重建,从正常供者鼠分离的卫星细胞可以使肌营养不良小鼠的营养不良蛋白表达。卫星细胞是成肌细胞的前体细胞,后者可以融合为新的多核肌纤维。最近许多研究证实骨骼肌来源的多能干细胞(MDSCs)的存在。分离到的这一细胞群体体外可以分化为肌肉、脂肪、骨和软骨细胞。MDSCs 还可以分化为间充质组织,在功能上可以重建肌肉和骨,在软骨损伤修复中也起关键作用^[27]。此类细胞群体是否是存留在骨骼肌中的间充质干细胞还有待进一步研究。

从成体小鼠分离到的肌肉来源的细胞移植到致死量照射过的受体鼠,可以使后者重建造血。不同的实验室从肌肉分离的可以使造血重建细胞表型大同小异^[28]。体外研究表明转录因子 Pax7 是 MDSCs 向肌肉方向分化所必需的,Pax7^{-/-}小鼠完全缺失肌肉卫星细胞,而从肌肉分离的 SP 细胞却未受影响。有趣的是来自 Pax7^{-/-}的 MDSCs 其造血集落的形成比野生型高 10 倍^[29]。所以 MDSCs 与肌肉卫星细胞可能是不同的细胞群体,到底是什么表型的细胞具有肌肉卫星细胞或 MDSCs,及其起源尚有待进一步研究。

六、心脏干细胞及其可塑性

过去一直认为成体心脏的心肌细胞是终末分化的细胞,目前发现成人心脏也有进行有丝分裂的细胞存在。但是成体心脏的增殖能力不足以重建因心肌梗塞引起的大面积的组织损伤。最近的心脏移植病人的研究引起人们极大的兴趣并提示成体心脏可能存留有干细胞。将女性供者的心脏移植到男性病人,在移植的女性心脏和男性受体残留的心脏中不仅出现原始细胞,而且在女性供者心脏的心肌、动脉、毛细血管中出现 Y 染色体阳性原始的未分化细胞,表达 c-kit, Sca-1 和 MDR1 的干细胞表型,但细胞数目较少。有的 Y 染色体阳性的细胞表达早期心肌细胞发育有关的转录因子 MEF2 和 GATA4 以及中间丝和 Nestin,说明 Y 染色体阳性的细胞来自男性受体干细胞定向分化的心肌细胞。Quaini 认为在女性供者心脏和男性受体心脏存留有内源性的原始干细胞,可以分化为心脏的细胞。虽然也可能是男性受体心脏外的细胞如骨髓细胞迁移至心脏所致,但是女性供者心脏原始细胞的骨髓细胞系的表型是阴性的^[30]。虽然心脏干细胞的来源还有待于进一步研究,但心脏干细胞的存在及其潜在的应用和研究价值将引起人们极大的关注。

七、成体干细胞可塑性的几种假设

成体干细胞存在可塑性这一现象已被很多科研工作者所证实,正是成体干细胞具有可塑性这一重要生物学特征,才使人们认识到成体干细胞在再生医学上的应用,可能治疗心血管疾病、神经退行性疾病,糖尿病及癌症等疾病提供美好的应用前景。对于如何认识可塑性现象还存在争议,但对于可塑性的正确认识将影响着成体干细胞的应用。

成体干细胞可塑性主要存在以下几种假设:

第一,干细胞的分化潜能被认为是因成熟细胞的去分化,从而具有了干细胞的多向分化潜能。

第二,对干细胞可塑性的认识,有可能是干细胞之间存在横向分化(transdifferentiation),即干细胞之间的转变。例如,造血干细胞具有的多系分化潜能,是由于造血干细胞成为具有其他特征的干细胞如神经干细胞,后者进一步分化为神经元或胶质细胞。

第三,最近, Nature 发表的两篇文章,认为干细胞的可塑性可能与细胞融合有关。在体外培养体系,胚胎干细胞可以与造血干细胞和神经干细胞^[31,32]融合,融合的骨髓细胞继承了胚胎干细胞的

表型特征。而融合的神经干细胞不但继承了胚胎干细胞的表型,当将其注射到胚泡还显示了其多系分化潜能,并有致瘤性。作者同时假设此融合现象也可能发生在体内或成体干细胞与体细胞的融合。例如:从成体小鼠大脑中分离出的神经干细胞在体外与拟胚体或肌细胞系共培养,发现神经干细胞表达骨骼肌细胞的表型。说明神经干细胞可以分化为肌肉细胞有的还形成多核肌管。有可能是细胞融合引起的神经干细胞的多向分化潜能。

此融合现象的发生频率是非常低的,前者只有 $2-11$ 个/ 10^6 骨髓细胞,而后者为 1 个/ 10^6 。2003 年 3 月 Wang 等在 Nature 发表的一篇文章,用确凿的证据在体内证实了来自骨髓的肝脏细胞主要是通过细胞融合来实现的^[33]。Wang 等用延胡索酰乙酸水解酶缺陷的小鼠模型并进行系列的骨髓来源的肝细胞移植,肝脏功能恢复正常的受体小鼠重建的肝脏细胞来自供体细胞,雌性供体来源的肝脏细胞,表现二倍体和四倍体的融合核型,并从同一个细胞检测到供体的表型和雄性受体小鼠的 Y 染色体,作者认为骨髓来源的肝脏细胞是由于细胞融合而非造血干细胞分化实现的。但是否所有的干细胞的可塑性现象都是由于细胞融合来实现的,仍有待于进一步研究。

第四,成体内存在的具有多系分化潜能的干细胞,我们实验室也提出可能是胚胎发育过程中胚胎细胞残留在机体不同的组织器官中,并在壁龛的作用下保持静息状态,一旦其所存留的组织受到损伤需要修复,在特定的微环境下被激活并分化为所需的细胞。Jiang 从成体小鼠骨髓分离到的多能成体干细胞除了能分化为三个胚层的细胞外,还表达胚胎干细胞的标记 Oct-4,而且用 PCR 证明分化的细胞是同一个细胞来源的,说明此类细胞具有胚胎细胞的特征^[34],同时也证实了此观点是正确的。

正是基于这一观点,我们才认为体内有可能有胚胎发育存留的血液血管干细胞。早 90 年代初我们室庞文新在骨骼肌重建造血方面作了开创性的研究^[35]。另外,骨髓来源的具间充质表型的干细胞输入经超致死量射线照射后,配合 G-CSF 等细胞因子可以重建受体小鼠的造血功能^[36]。并认为造血干细胞、间充质干细胞和血液血管干细胞可能起源于更原始的干细胞,即亚全能干细胞^[37],此干细胞存留在机体组织的壁龛中,维持了胚胎细胞的原始潜能。

但是干细胞可塑性的正确认识仍有待于进一步研究。

八、成体干细胞可塑性的争议

目前对造血干细胞和神经干细胞的分化潜能的研究,有些学者提出了质疑。

神经干细胞能否向造血细胞分化? Morshead 从小鼠胚胎分离到的 ROSA26 神经球细胞,证明低于 1% 的细胞具有神经干细胞的特性。作者重复了 Bjornson 神经干细胞向造血细胞分化的动物模型,检测了 31990 个克隆,结果也没有发现一个神经干细胞来源的造血细胞集落,认为神经干细胞向造血细胞分化的可能性非常小^[38]。但 Bjornson 认为 Morshead 分离到的神经干细胞的数量和潜能远远低于他们分离到的神经干细胞。究竟是否具有造血潜能仍有待于在克隆水平上证实。另外,造血干细胞能否向神经细胞分化? Castro 等对此重新做了实验^[39]。他们将 ROSA26 小鼠的 SP 造血干细胞或全骨髓细胞移植到 8 只致死量照射的 C57B1/6 小鼠体内,除了能重建造血外,对中枢神经系统(包括嗅球和颈部的脊髓)的 50-100 张切片/小鼠,做了检测,结果在中枢神经系统只发现低于 5 个供者来源的细胞与血管有关,但没有发现与神经细胞表型相关的供者细胞。同样,应用全骨髓细胞或 SP 细胞群移植到中枢神经系统持续损伤的小鼠体内,得到同样的结果。此结果与以往骨髓干细胞向神经细胞分化的结果不同,Castro 等的解释是骨髓向神经分化不是一个普遍的现象,可能与实验系统有关。另外,Castro 等证明 SP 细胞群还可以分化为骨骼肌细胞,在此之前此小组已经证明 SP 细胞群体内可以向血管内皮细胞分化并可以修复缺血受损的心肌^[8]。

2002 年 9 月 Wagers 将有 GFP 标记的 c-kit⁺ Thy1.1^{low} Lin⁻ Sca-1⁺ 单个造血干细胞移植到致死量照射的受体小鼠,重新检测 GFP⁺ 细胞在受体各组织的分布,虽然单个细胞能够重建造血,也能证明单个造血干细胞来源的细胞广泛分布于其他组织,如脑、肝脏、肾、胃肠道、骨骼肌、心肌和肺脏等。但在肌肉、肺脏、肠道和肾脏中的 GFP⁺ 的细胞并不像 Krause 报道的表达各组织特有的细胞表型。只是在肝脏发现了表达白蛋白的 GFP⁺ 肝脏细胞,但频率非常低,只有 1/70000,并非像 Krause 报道的可以形成明显结节状的肝细胞。另外,在 60 张脑矢状冰冻切片中发现 1 个 GFP⁺ 非造血细胞的 Purkinje 细胞。即便是在急性损伤的小肠中,造血干细胞也未分化为小肠的上皮细胞。从而认为至少从造血干细胞这一角度,向非造血细胞横向分化的潜能是极低

的。与 Wagers 工作比较,Krause 移植的干细胞还是有区别的,其将 Lin⁻ 细胞用膜荧光标记后,移植到致死量照射的受体小鼠 48 小时后,分选荧光标记的单个骨髓细胞,再次移植 11 个月后,约有 17% 的小鼠可以重建造血。分析移植前后的细胞表型发现,CD34⁺ 和 Sca-1⁺ 的细胞的比例增加,说明此过程可以富集造血干细胞,也证明了其自我更新的潜能。经存活小鼠的胃肠、肺和皮肤等组织检测,发现有造血干细胞来源的上皮细胞。两者的结果有如此差异,可能与两者选用的造血干细胞来自不同群体有关^[40]。

对于极少量的造血干细胞分化而来的肝脏细胞 Wagers 也没有给以更好地解释这不是干细胞的可塑性。另外,Wagers 的确也没有否定其他细胞的分化潜能。有可能是骨髓内其他干细胞(如 Jiang 等分离具有多能分化潜能的骨髓间充质干细胞^[34])有这样的多系分化潜能。

因此,对干细胞的可塑性目前存在质疑,应该是对干细胞本身固有特征的进一步认识,其分化潜能到底有多大,不同实验室因分离干细胞的方法不同而使干细胞本身的分化潜能存在差异,所选用的实验模型的不同等都是有待进一步研究的问题。

九、小 结

综上所述,具有自我更新、多向分化潜能和增殖特性的干细胞分布在各组织器官。目前的研究表明,当组织器官受到损伤时,干细胞被激活,对受损的组织进行修复重建。但这种自身修复毕竟是有限的,必须通过移植干细胞才能达到治疗相关疾病的目的。就目前的研究阶段,利用成体干细胞作为临床治疗的手段也有成功报道:如移植胎儿神经干细胞治疗帕金森氏综合征,骨髓移植治疗血液系统疾病,移植皮肤干细胞治疗烧伤,肌肉卫星细胞治疗肌肉损伤等等。但是成体干细胞由于数量很少,难于克隆而使其应用受到限制。对于干细胞的可塑性,目前也只是处于基础研究阶段,并且还存在许多争论性的问题没有解决,比如分化的干细胞是否具有功能,是否有足够的数量和潜能,是否有致癌性的危险等等,所以应用成体干细胞治疗疾病和胚胎干细胞一样存在种种困难。因此,揭示干细胞发育的分子机制的研究,干细胞移植的免疫问题,影响干细胞移植成功的因素如:干细胞的来源,干细胞的发育状态,自然凋亡过程,宿主提供的微环境,都是有待深入研究及亟待解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Reyes M., et al., 2001, *Blood*, **98**:2615-2625.
[2] Ferrari G., et al., 2001, *Nature*, **411**:1014-1015.
[3] Petersen BE, et al., 1999, *Science*, **284**:1168-70.
[4] Theise ND., et al., 2000, *Hepatology*, **32**:11-16.
[5] Wang JS., et al., 2000, *J Thorac Cardiovasc Surg.*, **120**:999-1005.
[6] Toma C., et al., 2002, *Circulation*, **105**:93-98.
[7] Orlie D., et al., 2001, *Ann N Y Acad Sci.*, **938**:221-229.
[8] Jackson KA., et al., 2001, *J Clin Invest.*, **107**:1395-1402.
[9] Mezey E., et al., 2000, *Science*, **290**:1779-1782.
[10] Brazelton TR., et al., 2000, *Science*. Dec 1., **290**:1775-1779.
[11] Krause DS., et al., 2001, *Cell*. **105**:369-377.
[12] Kotton DN., et al., 2001, *Development*. **128**:5181-5188.
[13] Imasawa T., et al., 2001, *J Am Soc Nephrol.*, **12**:1401-1409.
[14] Grant MB, et al., 2002, *Nat Med.*, **8**:607-612.
[15] Pelosi E., et al., 2002, *Blood*, **100**:3203-3208.
[16] 郭虹等, 2002, 中国医学科学院学报, **24**:606-610.
[17] Seaberg RM. and van der Kooy D., 2002, *J Neurosci.*, **22**:1784-1793.
[18] Rietze RL., et al., 2001, *Nature*, **412**:736-739.
[19] Vescovi AL., et al., 2002, *Nat Med.*, **8**:535.
[20] Taguchi M., et al., 2002, *J Pathol.*, **197**:638-646.
[21] Lardon J., et al., 2002, *Histochem Cell Biol.*, **117**:535-540.
[22] Forbes S., 2002, *J Pathol.*, **197**:510-518.
[23] Yang L., et al., 2002, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**:8078-8083.
[24] Dabeva MD., et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**:7356-7361.
[25] Ghazizadeh S., et al., 2001, *EMBO J.* **20**:1215-1222.
[26] Lako M, et al., 2002, *J Cell Sci.*, **115**:3967-3974.
[27] Adachi N., et al., 2002, *J Rheumatol.*, **29**:1920-1930.
[28] Jankowski RJ., et al., 2002, *Gene Ther.*, **9**:642-647.
[29] Seale P., et al., 2000, *Cell*. **102**:777-786.
[30] Quaini F., et al., 2002, *N Engl J Med*. **346**:5-3415.
[31] Terada N., et al., 2002, *Nature*, **416**:542-545.
[32] Ying QL., et al., 2002, *Nature*, **416**:545-548.
[33] Wang X. et al., *Nature*, published online 30 March 2003 ahead of print.
[34] Jiang Y., et al., 2002, *Nature*; **418**:41-49.
[35] Pang W. 2000, *Blood*. **95**:1106-8.
[36] 呼莹等, 2002 中国医学科学院学报 **24**:20-24.
[37] Guo H., et al., 2002, *China J of Mod Med.*, **12**:1-6.
[38] Morshead CM., et al., 2002, *Nat Med.*, **8**:268-273.
[39] Castro RF., et al., 2002, *Science*, **297**:1299.
[40] Wagers AJ., 2002, *Science*. **297**:2256-2259.

真核生物细胞中无终止密码 mRNA 的降解

甘 强* 王逸云

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

摘 要 2002年, Frischmeyer 和 Hoof 等人发现真核生物细胞中具有一种新的 mRNA 监视机制——无终止密码 mRNA 降解途径, 与正常 mRNA 和无义 mRNA 降解途径不同, 无终止密码 mRNA 是在外切酶体介导作用下快速脱腺苷并进行 3'→5' 方向的水解。本文对无终止密码 mRNA 降解途径的研究现状做一简要介绍。

真核生物细胞中存在不同的 mRNA 降解途径, 对于正常 mRNA 降解, 目前已发现 3 种途径。第一, 主要途径是从 Poly(A) 尾巴水解缩短开始的, 随即进行 5' 端脱帽和 5'→3' 方向核酸外切酶作用的水解; 其次, Poly(A) 尾巴水解后直接进行 3'→5' 方向的水解; 第 3 种途径是特异性的核酸内切酶催化的 mRNA 降解^[1]。对于由于模板 DNA 突变、转录及加工过程的固有误差而产生的异常 mRNA (例如由编码氨基酸的密码子突变为终止密码子而使翻译提前终止的无义 mRNA 以及从核中逃逸出来含有内含子的 mRNA 等), 细胞依赖一种称为无义介导

mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 途径降解^[2-4], 与正常 mRNA 降解途径不同, NMD 不依赖于 Poly(A) 尾巴的水解缩短而直接进行 5' 端脱帽和 5'→3' 方向的水解。正常 mRNA 和上述的异常 mRNA 都具有终止密码, 但研究表明, 细胞中有些 mRNA 没有终止密码, 在原核生物中, 由无终止密码 mRNA (Nonstop mRNA, NS mRNA) 翻译成的蛋白质经修饰后其羧基末端附加了一段由 tmRNA (transfer-messenger RNA) 编码的

* 通讯作者。E-mail: todna@sina.com