

文章编号:1004-0374(2005)01-0025-05

成体干细胞的可塑性：横向分化还是细胞融合？

钱 晖^{1,2}, 黄淑贞^{1*}

(1 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040; 2 江苏大学医学技术学院检验医学研究所, 镇江 212001)

摘要：近年来研究显示成体干细胞(adult stem cells)具有可塑性(plasticity), 不仅可以生成它们所在组织的成熟细胞, 而且在特定环境下能分化成其他组织类型细胞, 这种跨系或跨胚层分化现象称为横向分化或转分化(transdifferentiation)。横向分化已为成体干细胞的研究和临床应用包括组织器官损伤的修复提供了新的思路和应用前景。然而, 最近的一些研究进展又引出不同的解释, 即成体干细胞的可塑性是由于细胞融合(cell fusion)的结果。在此, 就成体干细胞的可塑性、横向分化、细胞融合等方面研究作一综述。

关键词：成体干细胞；可塑性；横向分化；细胞融合

中图分类号：Q813.2；Q254 文献标识码：A

Plasticity of adult stem cells: transdifferentiation or cell fusion

QIAN Hui^{1,2}, HUANG Shu-Zhen^{1*}

(1 Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China;

2 School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

Abstract: Recent progress in stem cell researches indicates that adult stem cells maintain a high degree of plasticity for multilineage cell differentiation. Adult stem cells not only can differentiate into the cell types of the same tissues in which they reside, but also may transdifferentiate into a completely different tissue derivative. This transdifferentiation of adult stem cells has become a holy grail of stem cell therapeutics, promising the eventual clinical use of these adult stem cells in regenerating a cornucopia of damaged tissues. However, there are some other comments doubting its very existence, suggesting that cell fusion may explain some of the observed plasticity of adult stem cells. Here we review plasticity of adult stem cells, transdifferentiation and cell fusion.

Key words: adult stem cells; plasticity; transdifferentiation; cell fusion

鉴于干细胞的发现并取得突破性成果, 美国《时代周刊》把干细胞研究列入20世纪科技进展之首。胚胎干细胞(embryonic stem cells ES)被认为是全能性干细胞, 具有分化为各种器官、组织和细胞的潜能, 并能进一步发育到成体干细胞(adult stem cells)。成体干细胞的发现可追溯到20世纪60年代, 对造血干细胞(hematopoietic stem cells HSCs)的发现和认识有了提高的基础上, 认为成体干细胞是一群存在于已分化的组织中尚未分化的细胞, 它

们具有自我更新的潜能, 并且能够分化出组成该组织的各种细胞类型。随后的发现和研究表明神经干细胞(neural stem cells, NSCs)、间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)等也属于成体干细胞。人们普遍认为成体干细胞仅能生成它们所在组织的成熟细胞, 具发育限制性, 这也得到了传统胚胎发育生物学家的实验结果的支持。直至1997年, Wilmut等^[1]利用成年哺乳动物的体细胞与去核的卵母细胞融合并发育出了克隆个体, 证实体细胞通过基

收稿日期: 2004-04-12; 修回日期: 2004-06-21

基金项目: 国家“863”项目(2002AA216091)

作者简介: 钱 晖(1970—), 女, 博士生; 黄淑贞(1938—), 女, 研究员, * 通讯作者。

因组重编程(reprogramming),又能恢复其发育全能性。此外,成体干细胞分化潜能的研究也取得令人意外的结果。成体干细胞可塑性(plasticity of adult stem cells)概念的提出打破了发育限制性的传统认识,使成体干细胞的研究进入了重新审视与发展阶段。

1 成体干细胞的可塑性

许多研究使用骨髓细胞作为研究成体干细胞可塑性的主要材料,因为骨髓细胞容易得到且包括多种造血细胞和基质细胞。全骨髓移植的动物实验结果显示骨髓细胞可转变为神经胶质细胞、肌细胞、肝细胞、内皮细胞、成骨细胞等非造血细胞,证实骨髓细胞的可塑性和能分化为内、中、外三个胚层细胞。由此,区分骨髓中哪类干细胞具有这些横向分化潜能成为研究的热点。

动物体内实验研究证明,HSCs能够分化成肌细胞(心肌和骨骼肌)^[2]、肝细胞^[3]、血管内皮细胞、肺泡、支气管、胃、肠、肾小球、皮肤等细胞^[4-5]。很多的研究资料也表明,骨髓MSCs能分化成肌细胞、脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞和神经元样细胞,在体内外实验中MSCs均表现出向中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化的潜能。除骨髓的HSCs和MSCs外,研究还发现NSCs和骨骼肌干细胞也具有跨系分化的能力,NSCs可分化成血细胞和肌细胞等,骨骼肌细胞则可分化成血细胞。这些结果确实令全世界科学家为之兴奋,将通过成体干细胞的多向和横向分化为临床治疗相关疾病提供干细胞来源,造福人类,特别是心肌细胞再生、肝细胞再生、神经细胞再生,因为这些细胞在生命活动中具有极其重要的作用并与多种疾病相关。

随着对成体干细胞可塑性的关注程度加深,质疑和争议也不可避免^[6-7]。争论焦点主要可概括为:(1)研究材料中是否混有胚胎样原始干细胞,能表达ES细胞标志,如Oct-4、Rex-1以及SSEA-1,体外培养条件也类似于ES细胞,这种细胞也曾被称为多潜能成年祖细胞(multipotential adult progenitor cells,MAPCs);(2)干细胞的融合;(3)干细胞的异质性。

2 干细胞可塑性的解释

尽管许多动物体内实验证明成体干细胞可分化为不同组织的成熟细胞,但至今为止对成体干细胞可塑性发生的机制尚不清楚,无法给出一个令人非常满意的答案。

2.1 横向分化 成体干细胞研究较多的是骨髓干细胞(HSCs和MSCs)、骨骼肌干细胞和NSCs^[8-9],它们能够在不同的部位跨系分化形成其它组织细胞,尤其是骨髓干细胞能够在几种重要器官,如肝、心肌中成活,修复动物相应的组织损伤。在成体干细胞可塑性概念被广泛接受之前,有人认为这应该是受伤组织的“自然生理”现象,也有人认为组织损伤是成体干细胞在一定的水平上发生横向分化的基本条件,但确切的横向分化机制并不清楚。要解释这种横向分化,必须对上述成体干细胞的可塑性结果深入分析:首先,要排除是否有其他类型的组织干细胞“污染”,虽然这种组织干细胞数量少,但在环境改变时,它们完全有可能分化成为相应的组织细胞;其次,要考虑在所研究的成体干细胞中,是否带有胚胎样原始干细胞,这种细胞的数量更少,是处在胚胎干细胞与成体干细胞之间的一类细胞,在适当环境下能分化为相应的组织干细胞,从而分化成相应的组织细胞;再次,还要排除细胞的融合和基因的转移(详述见2.2细胞融合)。因此,要确证是横向分化比较复杂,但下述研究已证明横向分化确实存在。早期胚胎发育的研究结果显示胚胎发育中存在限制性,但这种限制性并非绝对,在特定发育阶段,通过改变环境或某些基因表达,能够调整和突破这种限制性,如背部神经管切除后,细胞正常分化改变,从外胚层向神经发育;在神经系统中表达Myo-D基因,神经细胞就转化成骨骼肌细胞;胰腺细胞中如表达C/EBP-*b*基因,能使其分化为肝细胞^[10];PPAR-*r*基因的过多表达,会使心肌母细胞转化为脂肪细胞。还有一个经典的例子是果蝇实验,由转录因子联合决定的发育限制性起源于同源转化,如衰退基因表达能使果蝇的腿转变为翅^[8]。这些结果和现象除了横向分化没有更好的解释,单个基因的变化能戏剧性的改变细胞的命运。

上述研究结果为成体干细胞提供了一种可能的横向分化机制解释,即在某一特定细胞发育阶段,某些基因表达的改变可诱导成体干细胞的横向分化,甚至将成体干细胞通过重编遗传程序分化发育为整个胚胎;但细胞在哪个发育阶段具有最大横向分化可能性还有待深入的研究,将来有可能通过控制横向分化过程来调节细胞发育的限制性,研究确定细胞中哪些因素能使细胞“重编程”。Liu和Rao^[8]提出了这种横向分化的可能机制(图1)。

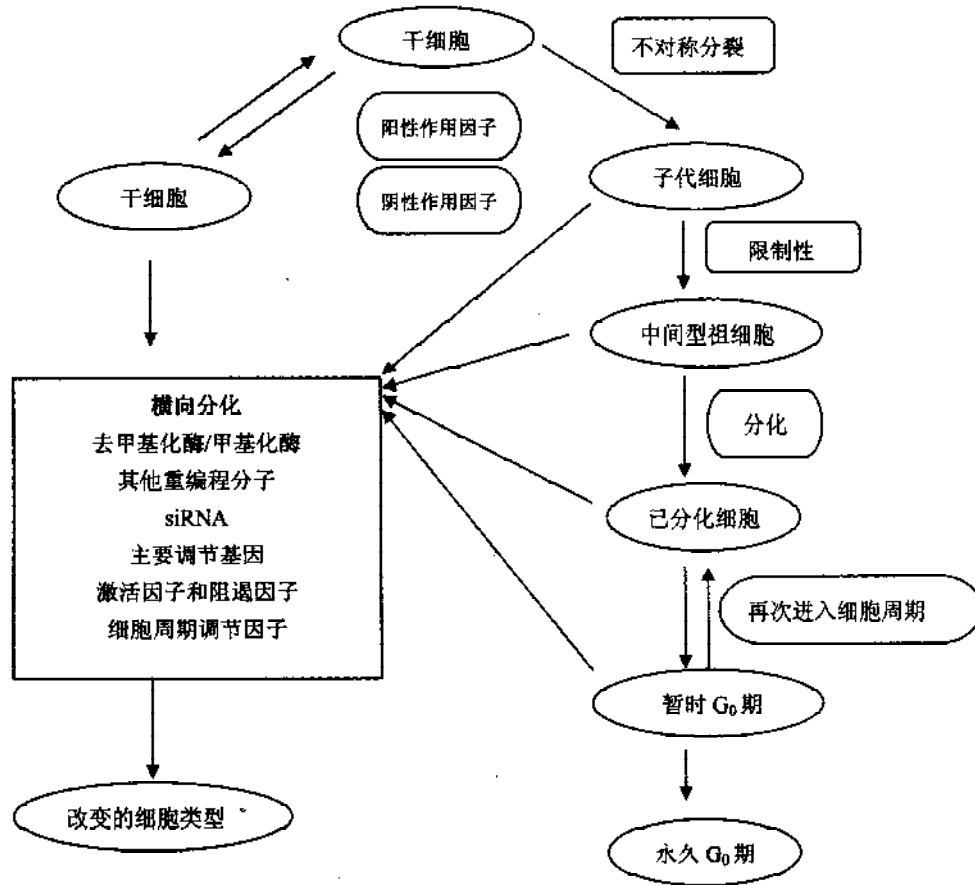


图1 细胞分化和横向分化示意图^[8]

图1说明干细胞在增殖分化为子代细胞的同时保留了极少一部分具有本身特性的干细胞,这是遗传稳定性的要求。子代细胞在限制性因素作用下生成中间型祖细胞,然后分化为成熟细胞或终未分化细胞。这些分化的细胞在特定的条件下再次进入细胞增殖周期,横向分化可能发生在正常干细胞发育的多个不同时期。维持多能干细胞开放转录可能需要正调节因子的存在和负调节因子的缺乏。早期细胞增殖需要去甲基化或甲基化酶、重编程分子及异染色质调节因子等的参与;激活因子、阻遏因子及调节基因在启动甲基化和异染色质化的过程中发挥重要作用;siRNA在调节细胞转录状态、维持稳定细胞类型中起作用。大部分成体细胞处于G₀期,要使成体G₀期细胞进入细胞增殖周期,还需细胞周期基因的活化诱导。此外,在成体细胞增殖和活化中尚有很多复杂机制的调节和相互作用。对于横向分化的发生,上述调节分化过程的途径一定要对外源性刺激敏感,许多实验资料已经证明外源性刺激能够诱导横向分化 例如:当神经纤维生长基因(neurofibramatiosis genes)突变时,神经细胞能转变为黑色素细胞,5-

氮胞苷或其他药物能使骨髓MSCs向心肌细胞分化,有些还原性物质,如巯基乙醇使MSCs分化为神经样细胞。

可以确定去分化和横向分化的途径确实存在,事实上调节一个稳定的细胞分化类型的各种机制能够在一种或几种系统中被否定或改变修饰。尽管对控制这种过程的确切机制没有太多的了解,但是这种机制的修饰或改变足以产生细胞类型的戏剧性变化。

2.2 细胞融合(cell fusion) 横向分化作为成体干细胞可塑性的一种较好的解释,已为一些科学家所接受,但最近的一些研究对此提出质疑。在探索成体干细胞可塑性的研究中发现了一种新的现象即细胞融合^[11-12]。Ying等^[11]在白血病细胞抑制因子(LIF)存在下,体外共培养鼠NSCs和胚胎干细胞,能使中枢NSCs转化成非神经系统细胞,但在此培养体系中发现了神经细胞和胚胎干细胞的融合细胞,它们是多倍体并能表达胚胎干细胞的标志,如碱性磷酸酶和特异胚胎抗原(SSEA-1),融合细胞发生的几率为万分之一到十万分之一。与此同时,Terada等^[12]发现鼠骨髓细胞与胚胎干细胞在体外发生融合现

象,培养中需IL-3维持。骨髓细胞与胚胎干细胞的融合,使更多的人相信通过细胞融合机制使骨髓细胞能在体内分化为肝、心肌、神经、脂肪等多种非造血组织细胞。Wang等^[13]再次证实细胞融合确实在体内发生,他们将骨髓HSCs经尾静脉移植后,采用Southern blot、FISH、染色体核型分析等证实移植后的肝组织中,具有多倍体的融合细胞,由此认为骨髓细胞转化来的肝细胞并非HSCs横向分化而来,而是细胞融合的结果。在鼠体内研究中发现0.02%~0.05%的供体转化细胞可能来源于细胞的融合^[14]。Vassilopoulos等^[15]的研究也同样证实移植骨髓HSCs再生肝细胞是通过细胞融合机制,融合后的肝细胞更多表现肝细胞特征,而造血干细胞的原有标记CD45不再长期表达。

不过,用细胞融合来解释成体干细胞的可塑性也有疑问。第一,在Orlic等^[2,16]研究心肌再生的实验中,没有发现细胞融合现象,并且排除多倍体细胞的存在。有些研究者是采用单个成体干细胞或克隆化细胞来研究可塑性^[4],研究中也未发现细胞融合现象。因此,细胞融合并不是骨髓中干细胞分化为肝、肺、内皮、心肌、神经等多种组织细胞的唯一解释。第二,最早提出这一观点的Terada等^[12]在文章中也谈到,他们并不知道是骨髓细胞中的哪一类型细胞发生了融合,而且Scal⁺Lin⁻的细胞成分在融合细胞中的数量并没有增加,故而推测HSCs本身可能不参与细胞融合过程。已有研究证明吞噬细胞或单核细胞培养中可发生细胞融合而形成多核巨细胞,细胞因子,如IL-3上调这一作用,所以Terada^[12]和Medvinsky等^[17]认为体外培养中可能是单核细胞、巨噬细胞,或它们的祖细胞参与了细胞融合。第三,干细胞研究的一个重要问题是必须明确区分细胞融合和横向分化。许多事件都能产生融合细胞,不可能所有的融合细胞都能转化成其他类型细胞,且与正常组织表现,基因表达谱和正常的生理功能基本一致^[17]。Wurmser等^[6]认为Ying和Terada所发现的融合细胞都具有胚胎干细胞的特点,这就提出了胚胎遗传程序可能隐藏在成体干细胞内,因而细胞融合可作为鉴定蛋白质促进胚胎干细胞全能性的一种手段。第四,细胞融合是否会引起肿瘤。在体外培养过程中如果发生细胞融合,有可能转化为肿瘤细胞,假如这种细胞融合发生在体内,那么融合后果就难以预测。虽然细胞融合发生的确切机制目前还不清楚,但融合现象本身、DNA突变或

细胞行为的变化令人担忧,近期Science有一篇题为“突变干细胞可能培植肿瘤”的新闻聚焦^[18],提出细胞融合在体内发生就会致瘤。第五,对干细胞可塑性的解释除了上述两种可能机制,还有其他假说,如终末分化细胞能去分化,并在横向分化为其他细胞时,获得干细胞样的特征,还有DNA的横向转移(horizontal DNA transfer)。

2.3 可塑性研究中的常用技术 细胞融合与成体干细胞的可塑性关系究竟如何呢?Ying等^[11]和Terada等^[12]的研究工作是开创性的,他们为干细胞分化的研究者们提供了一个新思路 and 警示。在研究过程中最重要的是要确定细胞是进行横向分化还是细胞融合,这必须采取多种技术进行详细的细胞遗传学分析,否则会引起诸多的混乱。当前成体干细胞可塑性研究中的常用技术有:(1)供体细胞人工标记技术,主要是应用转基因系统包括Lac-Z报告基因和绿色荧光蛋白(GFP)基因,通过转染报告基因使细胞带有特有标记而加以鉴别^[6];(2)供体细胞与受体细胞遗传标记差异的相关技术,如FISH技术^[13]、染色体核型分析^[11-13]、流式细胞技术^[2,12]、免疫细胞化学技术、RT-PCR^[12]等;(3)供受体细胞采用野生型和遗传缺陷型(突变型)替代细胞生化代谢功能的技术,较为常用的是Lagasse等^[3]采用酪氨酸酶缺乏症的小鼠为受体,接受骨髓细胞并观察肝再生后,酪氨酸代谢是否得到恢复,从而证明骨髓干细胞的可塑性及有无细胞融合的发生。此外,Wang等^[13]建立了延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoactatehydrolase, Fah)缺乏症小鼠模型,接受供体骨髓细胞后观察受体再生肝细胞对Fah缺乏的恢复情况,因该突变型是致死的,采用Southern blot证实Fah⁻鼠的肝细胞表达了Fah⁺,由此判定HSC能够再生肝细胞。这也是一个证实成体干细胞可塑性及细胞融合发生与否的较理想方法。

能够追踪供体细胞、鉴定细胞分化及观察细胞体内融合的方法较多,选择几种方法同时证明干细胞的可塑性、横向分化及细胞融合是必要的。严格的实验对照是上述实验的基本要求。

3 研究成体干细胞可塑性的几点建议

成体干细胞的临床意义众所周知,不仅可通过成体干细胞分化为其他组织细胞来治疗多种疾病和组织损伤,还能避免胚胎干细胞应用的伦理问题和致瘤反应。虽然本文涉及了一些成体干细胞可塑性的解释,但是必须更多地了解成体干细胞可塑性机

制,才能更好发挥它们对人类的作用,才能人为地调控成体干细胞的跨系分化。在此提出以下几点建议:(1)研究成体干细胞要有标准^[19]:干细胞来源必须清楚鉴定,如Y染色体标记、绿色荧光蛋白标记等,最重要的是应用干细胞的专一性标记;横向分化的细胞只能是细胞群体中的一少部分;横向分化的组织细胞具有分化细胞或器官相同的功能;理想的研究材料是选择均一或克隆来源的成体干细胞。(2)成体干细胞修复损伤的研究必须考虑以下因素:损伤组织释放的粘附分子和细胞因子的作用;损伤组织中富集的干细胞数量。(3)成体干细胞在横向分化中存在难易因素,如在同一胚层之间的横向分化较跨胚层细胞之间的分化更容易。(4)不同的成体干细胞可能存在不同的诱导分化策略,因此,在不同的横向分化中可能存在不同的机制或解释。不同种类的动物可能存在着诱导横向分化因子的差异。(5)调节甲基化、异染色质化和去分化作用的分子将在横向分化中起重要作用,特别值得提出的是有些凋亡抑制因子也参与了细胞横向分化过程。

目前对成体干细胞可塑性的解释颇多,如横向分化、细胞融合、去分化和核转移等。横向分化是一种客观存在;细胞融合作为干细胞可塑性的一种解释逐步受到人们的高度关注,可以推测通过提供健康、完整的基因组成分阻止细胞死亡,为遗传缺陷的纠正提供新基因等^[20],但任何一种解释都必须经过认真的分析和验证。也许一种成体干细胞的可塑性并存着几种解释,控制干细胞可塑性的调节因素,如甲基化、去甲基异染色质化、激活因子、阻遏因子等均发挥着重要的作用。融合的细胞组成的正确确定及其机制研究,对指导干细胞的临床应用具有重要意义。

致谢:感谢美国Stowers医学科学研究所的李凌衡教授和何曦教授对本文的指正和审校,使我获益非浅。致谢曾溢滔院士和任兆瑞研究员对本文的帮助!

[参 考 文 献]

[1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring

- derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813
- [2] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701-705
- [3] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 2000, 6: 1229-1234
- [4] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, 105: 369-377
- [5] Masuya M, Drake C J, Fleming P A, et al. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood*, 2003, 101: 2215-2218
- [6] Wurmser A E, Gage F H. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*, 2002, 416: 485-487
- [7] Wagers A J, Sherwood R I, Christensen J L, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 2002, 297: 2256-2259
- [8] Liu Y, Rao M S. Transdifferentiation-factor artifact. *J Cell Biochem*, 2003, 88: 29-40
- [9] Holden C. Cells find destiny though merger. *Science*, 2003, 300: 35
- [10] Shen C N, Slack J M W, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 879-887
- [11] Ying Q L, Nichols J, Evans E P, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, 416: 545-548
- [12] Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002, 416: 542-545
- [13] Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 2003, 422: 897-901
- [14] Jackson K A, Majka S M, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1395-1402
- [15] Vassilopoulos G, Wang P R, Russell D W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 2003, 422: 901-904
- [16] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10344-10349
- [17] Medvinsky A, Smith A. Fusion brings down barriers. *Nature*, 2003, 422: 823-825
- [18] Marx J. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*, 2003, 301: 1308-1310
- [19] Körbling M, Estrov Z, Champlin R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 32: s23-s24
- [20] Blau H M. A twist of fate. *Nature*, 2002, 419: 437