



钙离子和活性氧在多能干细胞中的功能和调控作用

洪雪君^{1,2}, 符江琴^{1,2}, 林东童^{1,2}, 张旖凯^{1,2}, 丁浩霖^{1,2}, 谭天欣^{1,2}, 李邱致^{1,2}, 李安琪^{1,2}, 刘兴国^{1,2,3*}

1. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州医科大学-中国科学院广州生物医药与健康研究院联合生命科学学院, 中国科学院广州生物医药与健康研究院-香港中文大学干细胞与再生医学联合实验室, 中国科学院广州生物医药与健康研究院-香港大学粤港干细胞及再生医学研究中心, 中国-新西兰生物医药与健康“一带一路”联合实验室, 粤港干细胞与再生医学联合实验室, 广东省干细胞与再生医学联合实验室, 广东省干细胞与再生医学重点实验室, 广州 510530;
2. 广州医科大学, 细胞命运调控与疾病粤港澳联合实验室, 广州 511436;
3. 中国科学院香港科学创新研究院再生医学与健康中心, 香港 999077

* 联系人, E-mail: liu_xingguo@gibh.ac.cn

收稿日期: 2023-12-25; 接受日期: 2024-03-19; 网络版发表日期: 2024-08-08

国家重点研发项目(批准号: 2022YFA1103800, 2022YFE0210100, 2019YFA0904500, 2023YFE0210100)、国家自然科学基金(批准号: 92157202, 32025010, 32241002, 92254301, 32261160376, 31970709, 32070729, 32100619, 32170747, 32322022, 32370782, 32371007, 32300608, 32300620)、国家自然科学基金委员会-香港研究局联合计划2022/2023(批准号: N_CUHK, 428/22)、中国科学院战略性先导研究计划(批准号: XDB0480000)、中国科学院研究项目(批准号: ZDBS-ZRKJZ-TLC003, 154144KYSB20200006, YSBR-075)、广东省科技计划(批准号: 2023B0303000023, 2023B1111050005, 2023A1515030231, 2022A1515110493, 2023B1212060050, 2021A1515012513, 2021B1515020096, 2022A1515012616, 2022A1515110951, 2023B1212120009)、广州市科技计划(批准号: 202102021037, 202102020827, 202102080066, 202206060002, 2023A04J0414)、Health@ InnoHK(批准号: N_CUHK)、中国科学院广州生物医药与健康研究院自立项目(批准号: KLRB202107)、中国科学院青年创新促进会基础研究项目(批准号: Y2021097, 2021355)资助

摘要 多能干细胞具有自我更新和多向分化潜能特性, 是再生医学的研究热点. 对多能干细胞的研究有利于理解发育等生理过程以及相关疾病发生机制, 有重要的理论研究价值和临床应用前景. 钙离子(calcium ions, Ca^{2+})和活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞内信号分子, 对干细胞的命运调控有重要的功能. 正常情况下, 一定的ROS水平下会维持干细胞自我更新和促进分化, 但过高的ROS水平则会诱发细胞凋亡. Ca^{2+} 可通过多种方式参与维持干细胞的自我更新, 包括钙依赖的细胞信号通路、细胞周期、表观遗传学修饰等, 而钙稳态、钙信号及其水平对于各种类型的干细胞命运决定具有深远的影响. 这些结果是推动干细胞领域发展的基础, 为生物医学研究和再生医学的进步提供新的机会和角度. Ca^{2+} 和ROS在干细胞中的功能和调控作用将继续成为研究和应用的关键焦点. 本文将论述ROS, Ca^{2+} 如何调控干细胞命运以及研究现状, 并展望该领域的未来发展方向.

关键词 活性氧, 钙离子, 线粒体, 表观遗传, 代谢, 多能性, 分化, 干细胞

引用格式: 洪雪君, 符江琴, 林东童, 等. 钙离子和活性氧在多能干细胞中的功能和调控作用. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1373–1385
Hong X J, Fu J Q, Lin D T, et al. Function and regulation of calcium ions and reactive oxygen species in pluripotent stem cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1373–1385, doi: [10.1360/SSV-2023-0316](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0316)

1 引言

1.1 ROS

在18世纪末至19世纪初ROS的存在被首次证明,然而对ROS的生物学意义尚不清楚. 20世纪80年代,ROS一词在各类生物学研究中出现,用以描述化学性质活泼,是一类比氧气及其衍生的含氧物质更加活跃的氧化代谢产物,主要包括超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基等^[1](图1). 根据来源,ROS产生可分为外源性(辐射、药物等刺激)和内源性,后者通过线粒体和NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶途径产生, NADPH氧化酶定位于细胞膜上,是ROS的主要来源. 此前的研究曾证明线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变可以下调线粒体氧化磷酸化,随后线粒体产生高水平的ROS^[2]. 体内ROS主要来源于线粒体中的有氧代谢,但有一些过氧化物来源于内质网和溶酶体. 据不完全统计,在有氧情况下细胞所消耗的氧气中约有2%被用于生成ROS^[3]. ROS,开始被认为是造成DNA损伤,破坏细胞稳态的元凶. 早期自由基理论指出,线粒体活性氧ROS(mitochondrial ROS, mtROS)引起衰老是因为mtDNA、线粒体蛋白和膜脂的毒性^[4]. 近十年来,越来越多的研究表明,细胞内ROS的产生和清除是处于一个动态平衡的状态,适当的ROS是维持细胞正常的生理功能所必须的,其作为第二信使以及对各种信号分子的修饰作用在维持干细胞自我更新和决定细胞命运中往往起着核心作用^[5].

1.2 Ca^{2+}

Ca^{2+} 作为机体不可或缺的元素之一,可以调节许多不同的细胞功能,参与凝血、神经递质和激素合成、酶活性调节、信号转导等多种生理活动^[6]. 细胞内钙的增加一般是通过跨质膜的钙内流或从细胞内钙库中释放引起的. 常见的细胞内钙库包括内质网(endoplasmic reticulum, ER)和肌肉中的肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR). ER/SR中钙的释放可由1,4,5-三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3)、环二磷酸腺苷核糖和钙等多种第二信使激活^[7]. 例如, Ca^{2+} 作为第二信使,主要是通过细胞内外形成离子梯度的形式传递细胞信号. 这种梯度的建立依赖于质膜、胞内 Ca^{2+} 存储细胞器膜及膜上存在的各种钙通道或钙转运蛋

白. 因此, Ca^{2+} 的增加受到膜上的各种钙通道打开的位置、范围和持续时间的调节. 大多数非神经元细胞内 Ca^{2+} 的释放是通过内质网膜中存在 IP_3 敏感的 Ca^{2+} 通道发生的. 存在于其他细胞器中的其他通道也有助于细胞内 Ca^{2+} 的释放,例如内质网中的利亚诺定受体(ryanodine receptors, RyRs)、溶酶体样细胞器中的烟酸腺嘌呤二核苷酸(nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP)触发受体和线粒体中的离子交换通道等^[8].

此外,参与 Ca^{2+} 释放的不同通道之间有广泛的互动和反馈. 例如,内质网释放的 Ca^{2+} 可以与 IP_3 受体(IP_3 receptors, IP_3Rs)和RyRs结合,刺激 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放,影响邻近的受体,并可能触发再生的 Ca^{2+} 波^[7]. 而当持续性的刺激消耗ER中 Ca^{2+} 的存储时,激活钙库操纵性 Ca^{2+} 内流(store-operated calcium entry, SOCE)通道被激活并打开,介导胞外 Ca^{2+} 进入^[9].

经典的 Ca^{2+} 释放通路依赖于磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)周期的信号转导途径. PI周期被许多与细胞表面受体结合的激素和生长因子所激活. 其中,两种主要的受体分别是G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCR)和受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)^[10]. 细胞外配体刺激这些受体可激活PI特异性磷脂酶C(phospholipase C, PLC). GPCRs通常激活PLC- β ,而RTKs通常刺激PLC- γ . 活化的PLC将膜结合的磷脂酰肌醇(4,5)二磷酸(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP_2)转化为 IP_3 和亲脂性二酰基甘油(diacylglycerol, DAG). IP_3 随后与主要位于ER上的受体结合,激活 IP_3R ,触发内质网中的 Ca^{2+} 快速释放到细胞质中. 同时, PIP_2 水解产生的DAG可以作为额外的第二信使,进一步激活通路下游靶点,如蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)^[10].

1.3 干细胞

干细胞是一组存在于人体中多个组织或器官中具有自我更新和分化能力的特殊细胞^[11]. 1981年,Evans和Kaufman^[12]首次成功从体外培养的小鼠囊胚中分离出小鼠胚胎干细胞,干细胞的研究拉开帷幕. 但由于生命伦理的限制,人类胚胎干细胞的获取十分不易,为解决这个问题,人们发现成体细胞依旧具有获得多能性的潜力,并尝试加以利用. 2006年,Takahashi以及Yamanaka^[13]在小鼠中使用诱导因子(Oct4, Sox2, Klf4和c-

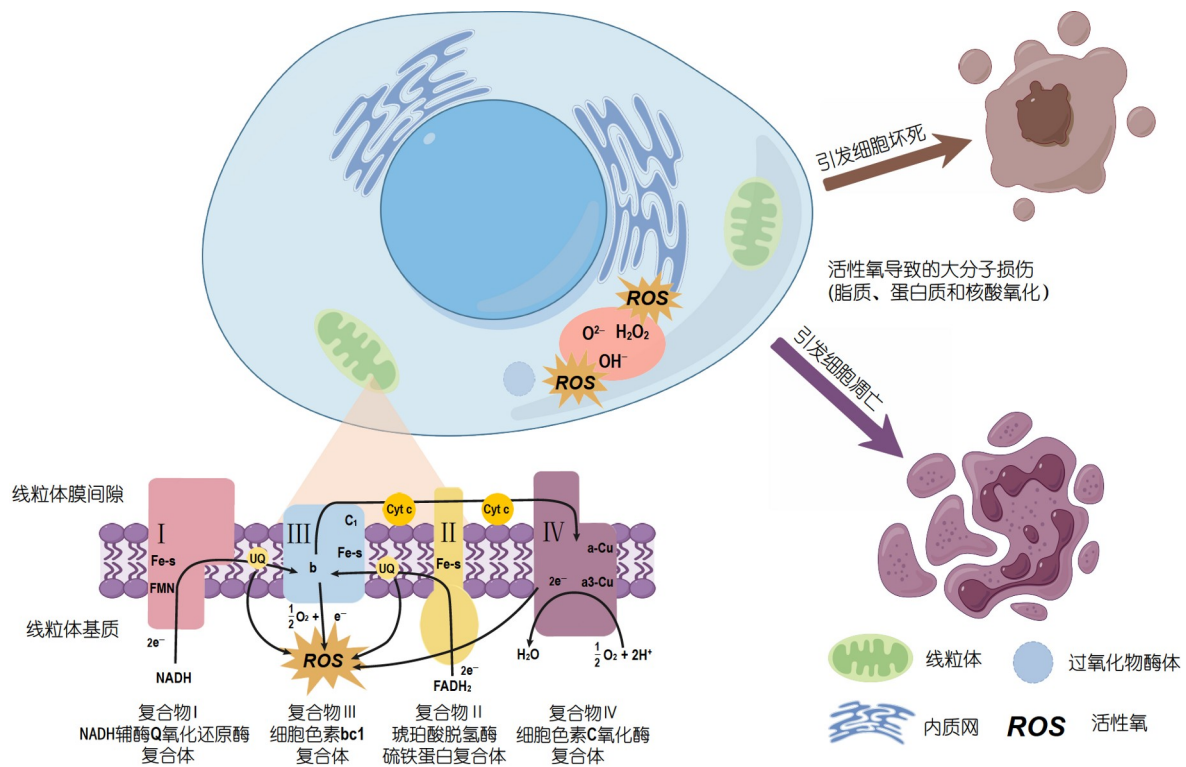


图 1 ROS的产生与ROS导致的细胞损伤. 本图由Figdraw绘制

Figure 1 Production of reactive oxygen species and cell damage caused by reactive oxygen species. By Figdraw

Myc)成功诱导成纤维干细胞转变为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 为干细胞的研究提供新的热点.

1.4 ROS, Ca^{2+} 与干细胞关系和研究意义

早期研究人员注意到, ROS和 Ca^{2+} 可能与细胞的生存和生物学功能有关. 然而, 对于它们在干细胞中扮演的具体角色尚不明确. 21世纪初, 研究开始关注ROS和 Ca^{2+} 在干细胞自我更新和干性特性维持中的作用, 在过去的20年中, 研究人员对ROS和 Ca^{2+} 如何影响干细胞的分化进行深入研究.

ROS和 Ca^{2+} 在干细胞的自我更新、分化和衰老过程中发挥关键作用, 因此对ROS和 Ca^{2+} 的深入了解可能有助于对抗衰老以及癌症等疾病的防治. 首先, ROS在干细胞自我更新和分化中扮演重要角色. Ca^{2+} 信号在干细胞生物学中具有重要作用, 是整合所有信号的关键变量. 因此, 研究ROS, Ca^{2+} 信号与干细胞关系的研究意义在于深入了解如何参与干细胞的自我更新、分化和衰老过程, 并寻找可能的治疗策略以改善

干细胞的命运决定, 同时将有助于理解不同类型的疾病包括多种退行性疾病. 本文将从ROS, Ca^{2+} 如何调控干细胞命运以及研究现状, 并展望该领域的未来发展方向. 旨在深入阐明ROS, Ca^{2+} 与干细胞之间的关系, 为开发干细胞治疗及组织工程应用提供理论依据和实验支持.

2 ROS, Ca^{2+} 与干细胞自我更新

2.1 ROS水平影响干细胞自我更新

随着研究的深入, ROS水平的高低能通过参与细胞信号转导以此促进细胞的增殖已经被证实. ROS在干细胞增殖中扮演着双重角色, 具有复杂性和多样性, 低浓度的ROS可以促进干细胞的正常增殖, 反之浓度高的ROS却会抑制干细胞的增殖, 甚至导致干细胞的死亡.

2011年, 有研究表明在生物体内, 毛细血管扩张性共济失调症突变基因(ataxia telangiectasia mutated, ATM)激酶是一种磷脂酰肌醇3-激酶相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase, PI3K-related kinase, PI3K-RK).

tidylinositol 3-kinase-related kinase, PIKK), 此激酶控制着造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的自我更新能力, 在Atm缺失的小鼠中表现出进行性骨髓衰竭, 此现象是由于HSCs存在功能缺陷^[14]. 利用清除ROS有起到抗氧化剂作用的*N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)治疗ATM缺失的HSCs可以显著的降低细胞内ROS水平并且恢复HSCs的再生能力, 此举有助于防止骨髓衰竭^[12]. 因此表明, ROS水平升高是ATM缺失小鼠中HSCs自我更新能力下降的原因. 2013年, 有研究人员在培养鼠精原干细胞的过程中添加抑制ROS功能的药物, 结果精原干细胞增殖的速度降低明显, 而向精原干细胞中添加与实验鼠的正常细胞相同浓度的ROS, 则精原干细胞的增殖得到促进^[15]. 也有研究表明, 在脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)中, 低氧条件下可以诱导NADPH氧化酶产生较高水平的ROS, ROS诱导磷酸化血小板原型生长因子受体- β (phosphorylated platelet-Derived growth factor receptor- β , p-PDGFR- β), 激活细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 又称AKT)通路, 促进ADSCs的增殖和迁移^[16]. 2011年, 有学者初步研究表明低浓度ROS可以促进神经干细胞(neutral stem cells, NSCs)自我更新, 同时维持自身基因组的稳定性和避免衰老^[17].

最近一项研究表明, PI₃K-AKT信号通路是HSCs自我更新的另一个关键的调控路线. PI₃K-ATK信号通路在调节细胞增殖和上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中起关键作用, PI₃K作为一种脂质激酶, 催化PIP₃的产生, PIP₃而后调节下游效应子AKT向质膜的易位. AKT在特定氨基酸被磷酸后激活, 作为第二信使进一步调控通路的下游靶点^[18]. FOXO(forkhead box O, FOXO)转录因子家族是PI₃K-AKT信号通路下游的重要靶点^[19]. 在静息状态的HSCs中, AKT不被激活, FOXO蛋白定位于细胞核中; 当HSCs受到体外的刺激后, AKT被激活, 诱导FOXO蛋白出核, 引起HSCs再生能力丧失^[20]. 早在2007年有报道称, 在*FoxO1*, *FoxO3a*, *FoxO4*, 基因缺失的小鼠中, 造血干细胞显示出体内长期再生能力的下降, 这也与ROS水平增加关系十分密切^[21]. 同时段也有研究表明, *FoxO3a*缺失的HSCs表现出自我更新能力下降和ROS水平升高, 这表明FOXO下调可以诱导ROS产生^[22]. 重

要的是, *Foxo3a*缺失的HSCs中, FOXO的靶基因SOD2和过氧化氢酶的表达会减少, 这两个基因参与ROS水平的调控^[23]. 因此, FOXO转录因子在调节ROS水平和维持HSCs自我更新能力中有着十分重要作用. 此外, 哺乳动物的雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)是PI₃K-AKT通路下游的另一个靶点, mTOR复合体1(mTOR complex 1, mTORC1)激活也会引起ROS水平升高导致HSCs功能障碍^[24,25].

众所周知, 肿瘤抑制基因*TP53*(cellular tumor antigen p53, *TP53*)是一种重要的抑癌基因, 也是癌症中最常见的突变基因. *TP53*基因激活会促进DNA修复, 或促进异常的细胞进行凋亡, 从而阻止癌症的发生和发展. *TP53*也参与HSCs的静息状态和自我更新能力^[26]. 有报道显示ROS能通过激活*TP53*, 引起HSCs的静息状态和自我更新能力下降^[27]. 因为干细胞处于未分化状态, 具有长时间增殖积累遗传损伤的潜力, 因此所有正常干细胞对ROS和氧化应激都高度敏感.

2.2 Ca²⁺影响干细胞自我更新

衰老是一个不可避免的复杂生理过程, 包括干细胞在内的所有的细胞都会随着时间的推移而发生衰老, 因此干细胞需要通过一定的机制不断维持自身的自我更新. Ca²⁺水平对于维持干细胞的自我更新和多能性、调节衰老干细胞的功能至关重要, 从Ca²⁺水平较高的老年小鼠中分离出的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 能够弥补衰老诱导的MSCs功能的丧失^[28]. 干细胞的存活和衰老的骨髓间充质干细胞的增殖也依赖于胞质Ca²⁺水平. Ca²⁺不仅可以恢复它们的增殖潜能, 而且还能使它们变成更年轻的干细胞谱系, 这对再生医学至关重要. Ca²⁺可通过多种机制参与维持干细胞的自我更新和多能性, 包括参与细胞代谢通路、细胞周期调控、基因表达调控等方面.

Ca²⁺可通过多种机制参与维持干细胞的自我更新和多能性, 包括参与细胞代谢通路、细胞周期调控、基因表达调控等方面.

代谢型谷氨酸受体5(metabotropic glutamate receptor 5, mGlu5)的存在及其在小鼠胚胎干细胞中的重要性在2005年得到证实^[29]. 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)在培养基中自我更新所必需的. LIF通过增加Oct3/4和Nanog转录因子的表达水平来促

进mESCs的持续增殖,而这些转录因子对胚胎干细胞的自我更新至关重要^[30]. LIF依赖的mGlu5受体刺激促进Oct4和Nanog的表达,以维持干细胞的增殖和多能性.同时,mGlu5受体数量的增加进一步放大外部LIF对mESCs的影响.用mGlu5受体激动剂Quisqualate Acid处理干细胞,会导致Oct3/4 mRNA水平升高,同时也提高细胞内Ca²⁺的水平,但前提条件是胞外不存在谷氨酸.综上所述,Ca²⁺可以通过mGlu5受体参与调控mESCs自我更新,但其中的分子机制至今尚不清楚.mGlu受体属于C类G蛋白偶联受体家族,其被认为可能参与ESCs的自我更新,因为它们在哺乳动物发育和细胞信号传导中发挥作用^[31~33].Cappucci等人^[29]研究发现,当LIF存在时mESCs表达mGlu5受体^[33],受体的激活增加细胞内的Ca²⁺浓度.而阻断mGlu5受体或抑制mGlu5受体表达不仅降低钙离子浓度,还会降低Oct4和Nanog的表达.这提示Ca²⁺可能通过mGlu5受体参与调控mESCs自我更新,但其中的分子机制至今尚不清楚.

原癌基因c-myc在维持mESCs自我更新和多能性^[13]中起着至关重要的作用.Todorova等人^[34]发现mESCs中表达溶血磷脂酸(lysophosphatidic acids, LPA)受体,LPA的存在使得mESCs中细胞内的Ca²⁺浓度增加,并且正向影响c-Myc的表达水平.即使在培养基中不存在外源性Ca²⁺的情况下,LPA的存在也会增加细胞内Ca²⁺,这表明Ca²⁺很可能从细胞内Ca²⁺中释放出来.这一过程涉及PLC的激活,且用BAPTA-AM螯合细胞质游离Ca²⁺或用特异性抑制剂U-73122抑制PLC,都会干扰LPA的这种作用.这些证据表明LPA会激活Ca²⁺释放的信号通路,从而影响c-Myc的表达水平,进而调控mESCs的自我更新.

TP53是多能性的主要负调控因子之一^[35].TP53作为转录因子激活p21基因的转录,其产物可钝化细胞周期蛋白E/cdk2复合物的激酶活性,而该激酶的活性对于胚胎干细胞^[36]增殖所必不可少的.TP53已被报道以Ca²⁺依赖的方式与细胞质微管共定位,且Ca²⁺对TP53活性具有潜在抑制作用^[37].此外,Ca²⁺依赖的TP53调控的另一种可能机制是钙激活蛋白酶诱导的TP53裂解.钙激活蛋白酶参与多种细胞过程,包括增殖、凋亡和迁移^[38].在细胞周期的G1-S转换过程中,钙激活蛋白酶在细胞核中积累并降解TP53^[39].钙激活酶被证明在其N端转录激活结构域内消化TP53^[40].也有研究表

明,内源性钙蛋白酶抑制素的表达可以稳定TP53,激活p21,从而抑制DNA合成^[40].因此,Ca²⁺依赖的TP53失活可以促进干细胞的细胞周期调控,促进干细胞增殖和自我更新.

2.3 ROS和Ca²⁺共同调节干细胞自我更新

越来越多的研究表明,ROS与Ca²⁺之间存在协同效应,两者的交互作用构成一个精细调控的信号网络,共同推动干细胞的有序增殖.一方面,ROS可以作为第二信使,介导Ca²⁺通道的活性.高浓度的ROS可以促使Ca²⁺通道的打开,增加细胞内Ca²⁺浓度^[41].这种信号传导机制可以快速响应外部刺激,例如生长因子的刺激,从而推动细胞进入增殖周期.这种ROS与Ca²⁺的协同效应可以调控细胞增殖速率,使其能够适应不同的生理条件.在干细胞中,这一协同效应特别重要,因为干细胞需要快速响应不同的信号,以维持其自我更新和增殖能力.

3 ROS, Ca²⁺与干细胞分化

3.1 ROS调控干细胞分化

随着研究的深入,人们越发清楚ROS在体细胞重编程中充当着重要角色,发现ROS通过改变干细胞命运,理解ROS对体细胞重编程的效应,对正确维持体细胞多能性以及诱导特定细胞系直接分化以应用于临床有很大意义.

重编程的效率有限仍然是应用的障碍,这与它的表观遗传障碍密切相关.研究表明,代谢物能够影响染色体的可及性并调节基因表达^[4].早在2016年,本实验室首次在体细胞重编程过程中使用mito-cpYFP检测线粒体超氧炫(mitoflash,即单个线粒体内超氧阴离子自由基自发的、爆发性生成的现象).在重编程的第0,3,5和8天检测mitoflash,发现mitoflash在体细胞重编程的早期阶段发生瞬时激活的现象^[42].这个促进功能是通过Nanog表达上调发生的,Nanog对干细胞的自我更新和干细胞的形成十分重要,本研究团队确定mitoflash通过启动子去甲基化促进Nanog表达上调增强重编程^[42](图2).在重编程早期阶段,mitoflash快速爆发增加时,Tet2更容易与Nanog启动子结合引起DNA去甲基化提高重编程效率调控细胞命运,研究者阐明机制,并系统验证ROS提高重编程效率的生物学功能,为此

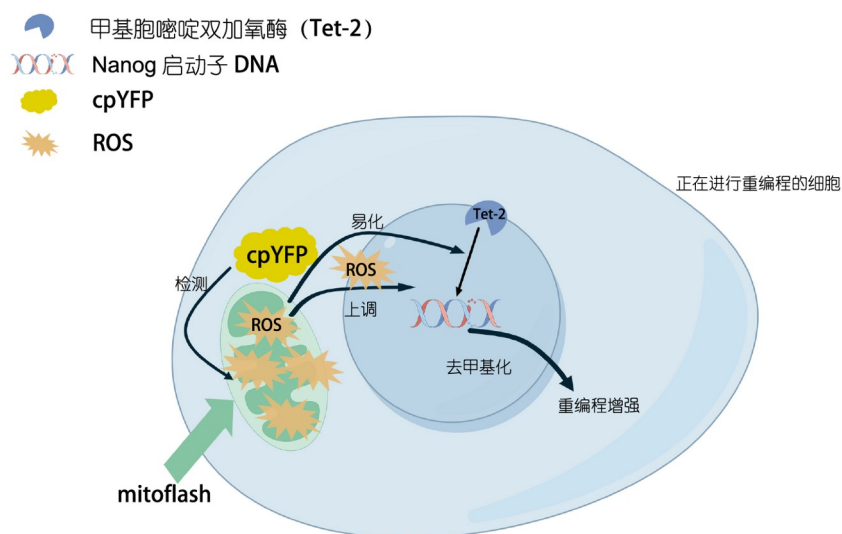


图 2 mitoflash增强重编程机制. 本图由Figdraw绘制

Figure 2 Mitoflash enhanced reprogramming mechanism. By Figdraw

领域的相关研究提供新思路^[42]. 此外, 本实验室另一项研究还发现, mtDNA突变可能通过下调氧化磷酸化、诱导ROS的大量产生干扰ESCs的代谢, 使ESCs表现出更多的全能性干细胞特征^[2]. 2019年, Burtenshaw等人^[43]描述细胞内ROS促进血管干细胞分化、增殖和迁移, 导致血管细胞命运的改变, 从而促进血管再生或者导致血管相关疾病, 如血管硬化等.

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)是存在于线粒体内外膜之间的蛋白复合物, 短期开放可以释放线粒体基质离子和代谢物^[4], mPTP是线粒体稳态的关键调节器, 在细胞的生存和凋亡中扮演着重要的角色. 本实验室研究发现, 在重编程早期阶段, mPTP经历短暂的开放, 引起MtROS释放, 触发下游的mtROS/miR-101c通路, miR-101c的增加促进细胞核内的植物同源结构域手指蛋白8(plant homeodomain finger protein 8, PHF8)的表达上升, PHF8的辅助因子 α -酮戊二酸(α -Ketoglutarate, α -KG)的水平也得到提高. PHF8通过减少H3K9me2和H3K27me3(重编程的障碍)的量, 并降低它们与多能性基因启动子的结合, 从而促进体细胞重编程^[44]. 该工作系统验证ROS提高重编程效率的生物学功能并阐明其机制, 为此领域的相关研究提供新思路.

MSCs是一种组织干细胞, 其具有多向分化潜力.

在体内, 骨髓、脂肪组织、肌肉、羊水和外周血等都是MSCs的主要来源^[45]. 不同部位的MSCs所处环境的O₂浓度也截然不同, 甚至在某些场所会出现O₂浓度低于1%的情况. 许多信号通路都会影响MSCs的最终命运, 其中包括Wnt, FOXO, Hedgehog, 这些通路调节MSCs向成骨和成脂谱系的终末分化^[46]. 也有研究发现, ADSCs成骨分化过程中, 线粒体功能活跃, 去乙酰化酶SIRT3表达增加, 后又发现SIRT3能通过去乙酰化激活超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD), 从而减少ROS堆积, 促进ADSCs成骨分化, 此外, SIRT3能直接与线粒体电子传递链的复合体相互作用, 影响线粒体电子传递功能, 降低ROS的生成, 从而调节ADSCs成骨分化^[47].

据报道, 线粒体调节裂变和融合的动态变化在干细胞的命运决定中发挥上游调节的作用, 通过调节复合体I介导ROS水平来调控NSCs命运^[48]. 线粒体动力学修饰ROS信号来指导干细胞的命运激活核因子-E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)依赖的发育通路, 通过NRF2介导线粒体到核逆行途径修改干细胞的核转录谱^[48]. 从本质上来看, 这项研究提出一个线粒体结构变化指导干细胞命运的模式, 在这个模型中, NSCs中延长的线粒体维持着较低的ROS水平并促进自我更新, 而线粒体向碎片化状态发展导致ROS水平增加, 诱导抑制自我更新的基因表

达, 同时影响干细胞命运^[48].

总之, ROS在干细胞命运调控中扮演着十分重要的作用, 这些结果为干细胞命运决定的基本机制提供见解. 在干细胞领域的工作已经提出ROS在干细胞分化中的作用, 但其机制尚不完全清楚. 虽然关于ROS在干细胞分化中的研究已经取得一定的进展, 但仍存在许多问题和挑战, 对于ROS如何参与干细胞分化的具体机制仍需深入研究.

3.2 Ca²⁺影响干细胞分化

细胞命运决定和细胞分化依赖于多种信号分子和转录因子精确而严格的调控. Ca²⁺是细胞内重要的第二信使, 可以通过多种方式在多种干细胞的分化中发挥重要作用.

大量研究表明, Ca²⁺在ESCs的分化过程中起着直接且重要的作用. Ca²⁺瞬变的时空动态变化在非洲爪蟾胚胎的神经诱导中发挥重要作用^[49-52], 而Ca²⁺信号变化则影响着mESCs的神经分化. 这种变化并被认为是由于Ca²⁺通道、泵或Ca²⁺相关蛋白的动态表达而引起的. 在mESCs的神经分化过程中, 不同类型的钙离子通道或钙相关蛋白会在随着分化过程逐渐表达或在分化的不同阶段表现出不同程度的表达: RyR2型在神经分化开始后第5天开始表达且逐渐增加; RyR1型和RyR3型则在神经分化后第8天检测到弱表达^[52]; 而ER的Ca²⁺传感器1(stromal interaction molecule, STIM1)在神经分化的不同阶段表现出不同的表达^[53]. 此外, 作为内质网重要的Ca²⁺释放通道, IP₃Rs在ESCs向造血和心肌谱系分化的命运决定中起重要作用. 造血和心肌谱系均来自中胚层来源的心脏/造血祖细胞的分化, 造血中胚层的出现依赖于IP₃Rs介导的钙信号, 而IP₃Rs介导的钙信号缺失则促进其向心肌谱系的分化并抑制其向造血谱系分化^[54].

研究表明人脂肪来源性干细胞(human adipose-de-

rived stem cells, hASCs)的分化可能受到精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)调控^[55]. AVP是一种神经肽激素, 主要分泌于垂体后叶, 主要通过V1受体增加Ca²⁺信号. Tran等人^[55]发现AVP可刺激hASCs在脂肪形成过程中, V1a受体、Gq蛋白和PLC-IP₃通路介导细胞内Ca²⁺的浓度增加. 此外, 在成脂培养基中添加AVP使得脂肪细胞形成数量减少, 且这种影响可以被V1a受体阻断剂V2255逆转, 提示AVP可能具有抑制脂肪细胞分化的作用.

Deng等人^[56]发现钙信号能促进肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)的增殖, 甚至增强肠道干细胞的分化. 在果蝇的中肠内, L-谷氨酸被吸收后诱发代谢型L-谷氨酸受体介导下的PLC激活过程, 降低细胞内钙振荡的频率, 但细胞内的平均胞质钙增加^[57]. 当胞质钙的含量增加以后, 会使得细胞内存在的环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)调节的转录共激活因子(CREB regulated transcription coactivator, CRTC)被激活, 最终促进肠干细胞的增殖. 此外, 许多信号通路的损伤也会导致细胞内的钙振荡减少和胞质钙升高. 这些研究结果说明钙离子是诱导肠道干细胞增殖信号的主要整合者^[56]. 然而, 钙离子对哺乳动物内的肠道干细胞的作用如何目前尚不清楚.

研究表明钙信号能够通过钙蛋白酶影响干细胞的DNA去甲基化过程, 进而影响干细胞的自我更新. 钙蛋白酶家族是一个由14种同源蛋白水解酶组成的酶家族, 参与多种蛋白质的翻译后调节^[58]. Wang和Zhang^[59]证明钙蛋白酶能够靶向降解小鼠胚胎干细胞内的10-11易位蛋白(ten-eleven-translocation protein, TET)调节TET的表达量. TET酶能够将5-甲基胞嘧啶(5mC)转变为5-羟甲基胞嘧啶(5hmC), 5hmC是5mC去甲基化的产物, 同时也可以作为一种表观遗传的标记. TET2主要通过介导谱系特异性转录因子基因的特定定位点发生羟

表 1 Ca²⁺在不同干细胞中的调控方式

Table 1 Ca²⁺ regulation in different stem cells

干细胞类型	调控方式
ESCs	Ca ²⁺ 瞬变的时空动态变化、Ca ²⁺ 信号变化、IP ₃ Rs介导的钙信号
hASCs	AVP介导的V1a受体、Gq蛋白和PLC-IP ₃ 钙释放通路
ISCs	代谢型L-谷氨酸受体介导的PLC-IP ₃ 钙释放通路
HSCs	钙信号依赖的钙蛋白酶靶向调控TET酶

甲基化形成5hmC修饰, 抑制谱系特异性转录因子表达, 进而抑制造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)分化^[60].

4 ROS, Ca^{2+} 与干细胞凋亡

4.1 ROS与干细胞凋亡

细胞凋亡是一种高度规范程序化的细胞死亡的过程, 在维持组织稳态、正常发育以及各种疾病进展中发挥着关键作用^[61]. ROS信号作为重要的细胞信号分子, 既可以在高浓度下诱导细胞氧化损伤而激活凋亡, 也可以在低浓度时通过调节关键信号通路发挥凋亡保护作用. 深入研究ROS与凋亡的分子机制, 对相关疾病的干细胞治疗策略有重大意义.

大量研究表明, ROS水平升高可通过激活线粒体通路、P53通路促进各类干细胞发生凋亡. 在体外给予一定浓度过氧化氢(H_2O_2)可剂量依赖性地促进人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs)的早期和晚期凋亡, 细胞内ROS水平升高可导致线粒体膜电位消失, 激活促凋亡因子^[62]. 值得引起注意的是, 不同类型的干细胞对ROS刺激的敏感度存在明显差异. 例如神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs)与MSCs更容易受 H_2O_2 诱导发生凋亡, 研究发现这可能与c-Jun N末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路的差异性激活有关, ROS诱导JNK磷酸化及下游转录因子c-Jun激活在NPCs中更为显著^[63]. 上述研究表明, ROS可通过多种信号通路促进干细胞凋亡, 但其效应器的激活状态因干细胞类型不同而有所差异.

尽管高水平ROS具有促凋亡作用, 但ROS低浓度时也可起到抗凋亡保护作用. NRF2是重要的抗氧化转录因子, 可激活一系列抗氧化基因表达从而清除细胞ROS、保护细胞免受氧化损伤^[64]. 研究发现, 低浓度 H_2O_2 可显著增加骨髓干细胞NRF2的蛋白表达和核转位, 并激活其下游抗氧化酶HO-1的表达, 抑制氧化应激诱导的干细胞凋亡^[65]. NRF2或HO-1的抑制可逆转低浓度 H_2O_2 的抗凋亡保护作用. 这表明低水平ROS可通过激活NRF2介导的抗氧化通路发挥抗凋亡效应. 还有研究发现, 生理水平ROS来源于NADPH氧化酶如NOX4也可发挥抗凋亡作用, NOX4产生的低浓度 H_2O_2 可激活Ask1带来p38和JNK活化, 增强MSCs的存活能

力^[66]. 上述研究证实适量ROS可促进干细胞存活的保护作用.

4.2 Ca^{2+} 调节干细胞凋亡

细胞内钙信号在自噬、细胞凋亡和衰老中发挥重要作用. 例如, 在人子宫内膜干细胞(human endometrium-derived mesenchymal stem Cells, hMESC)中, 氧化应激会导致PLC/IP₃/IP₃R通路的激活, 使得细胞内储存的钙被快速释放^[67], 胞质钙含量升高, 最终细胞内钙的积累诱导hMESC死亡(图3). 谢雨华等人^[68]则发现机械门控离子通道Piezo1介导的钙内流, 使得细胞内钙通量增加, 诱导毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)凋亡. 他们发现Piezo1参与钙内流的产生, 而其缺失保护HFSCs免受拔毛诱导的细胞凋亡. 有趣的是, 同样都是钙的内流对干细胞衰老的调控作用, 周宜坤等人^[69]却发现硫化氢通过TRPV4通道介导的钙离子内流反而可以减轻人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, PDLSCs)衰老.

4.3 ROS和 Ca^{2+} 共同调节干细胞凋亡

ROS和 Ca^{2+} 在细胞凋亡中相互协同, 共同调控细胞的生死命运. 线粒体 Ca^{2+} 过载会增加ROS的生成, 它们共同诱导mPTP开放, 导致细胞发生凋亡. Ca^{2+} 、ROS与mPTP三者构成的前馈环还存在四个反馈回路: ROS可促进 Ca^{2+} 流入线粒体, 构成第一个正反馈回路, 简称为F1; ROS生成之后可促进自身合成, 构成第二个正反馈回路, 简称为F2; mPTP的开放可导致 Ca^{2+} 和ROS从线粒体中流出, 形成两个负反馈回路, 分别简称为F3和F4^[70]. 这些错综复杂的关系给人们了解该系统的运行机制造成一定的困难. 祁宏教授团队采用微分方程组描述 Ca^{2+} 和ROS调节mPTP开放状态的动力学过程. 鲁棒性分析结果表明, 虽然负反馈回路是系统产生振荡的前提条件, 但正反馈回路对维持振荡的鲁棒性有重要作用^[70]. 分岔分析结果表明, 正反馈回路对mPTP振荡的振幅有增强作用, 而负反馈回路对振幅有削弱作用^[70]. mPTP处于低振幅的振荡态有利于细胞存活, 脑细胞中mPTP的异常开放往往会导致阿尔兹海默症等神经退行性疾病, 本研究可能为这类疾病的防治提供一些思路.

这种协同效应涉及多个信号通路和分子机制, 为干细胞生物学和再生医学领域提供新的研究方向. 深

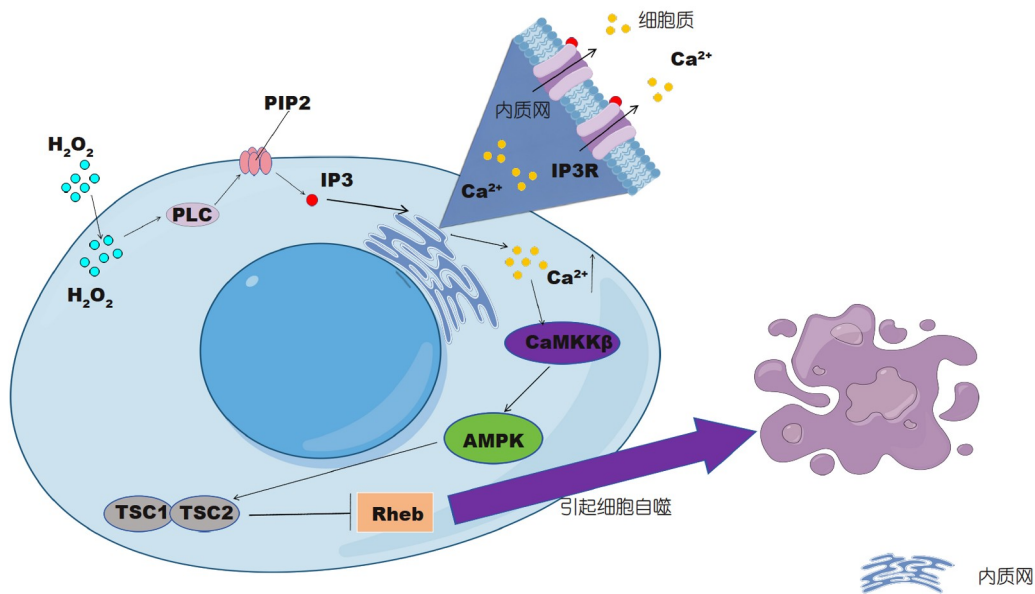


图 3 Ca^{2+} 调控氧化应激状态的干细胞产生自噬的机制. 本图由Figdraw绘制

Figure 3 Mechanism of autophagy production by Ca^{2+} stem cells that regulate oxidative stress states. By Figdraw

入了解ROS和 Ca^{2+} 在干细胞凋亡中的协同调控对于开发新的治疗策略和应用具有重要意义。

5 展望与未来

无论是ROS还是 Ca^{2+} ，它们在细胞中的所发挥的功能都是至关重要的，许多重要的生命现象和疾病都与ROS和 Ca^{2+} 有着直接或间接的关系。在干细胞中，它们可以发挥信使功能进行调控，从而影响到干细胞的自我更新、分化和凋亡等。

我们首次使用线粒体闪烁捕捉ROS信号^[42]，证明ROS在细胞重编程中发挥作用，ROS的早期激活有利于重编程的进行，这为深入氧对重编程的影响提供研究思路。同时，我们的研究表明ROS在细胞命运中DNA甲基化产生影响^[42]，此结果也为ROS调控的DNA甲基化的研究提供线索，这是一个良好的开端。ROS作为关键信号分子参与调控干细胞自我更新、分化、凋亡等过程。深入研究ROS在干细胞生物学中的作用，可以阐明调控干细胞功能的分子网络。解析ROS与干细胞功能的关系，可以提供调控ROS水平以提高干细胞活力、导向分化等的新策略。这对优化干细胞扩增、定向分化，以及提高组织工程和细胞治疗的效果具有指导意义。ROS失衡与许多疾病发生相关，研究ROS

在干细胞中的作用，有助于从干细胞水平阐明肿瘤、神经变性疾病等的发病机制。然而，如何精确地利用ROS来调控干细胞的命运仍然是一个挑战。未来的研究需要进一步深入理解ROS如何参与干细胞命运调控的机制，以便更好地将这种知识应用于干细胞治疗和其他生物医学领域。

线粒体 Ca^{2+} 和线粒体钙转运体在肿瘤细胞的能量代谢、自噬或线粒体自噬和凋亡中起着至关重要的作用。目前，针对线粒体钙转运体或其调控因子的候选药物仍在不断涌现。虽然一系列研究已经证实线粒体 Ca^{2+} 失衡与多种肿瘤进展之间的相关性，但其确切机制和靶向治疗仍有待进一步阐明。线粒体 Ca^{2+} 稳态的肿瘤诊断和治疗策略将为肿瘤风险预测、癌前病变筛查、临床靶向治疗和预后评估带来新的治疗手段。

干细胞、ROS和钙信号研究领域仍然充满挑战和机会。未来的研究将关注以下几个方面：随着技术的发展，希望有更多研究系统应用多组学和生物信息学方法全面解析ROS和该信号对干细胞的调控，在单细胞水平的研究将帮助揭示不同干细胞亚群的ROS和钙信号差异，以及其对命运的影响。开发针对ROS和钙信号的药物干预策略，以改善干细胞治疗和再生医学的效果，将ROS和钙信号的知识应用于组织工程和再生医学，以开发新的治疗方法。深入研究ROS和钙信号在

干细胞中的生物学意义, 包括其在疾病发生和发展中的作用. 未来的研究将进一步揭示ROS和钙信号在干细胞中的复杂作用, 这一领域的未来发展将持续引领细胞生物学和医学研究的前沿, 为干细胞治疗和肿瘤

治疗提供新的思路和方法. 未来, 这一领域可能会看到更多的临床应用, 例如, 使用干细胞和钙信号的知识来治疗神经系统疾病、心血管疾病和骨骼肌疾病等, 有望为疾病治疗和再生医学带来重大突破.

参考文献

- 1 Srinivas U S, Tan B W Q, Vellayappan B A, et al. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 2019, 25: 101084
- 2 Qi J, Long Q, Yuan Y, et al. Mitochondrial DNA mutation affects the pluripotency of embryonic stem cells with metabolism modulation. *Genome Instab Dis*, 2023, 4: 12–20
- 3 Sohal R S, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 1996, 273: 59–63
- 4 Liu Y, Ruan Z, Liu Z, et al. Organelle remodeling in somatic cell reprogramming. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12: 747–751
- 5 Chaube R, Hess D T, Wang Y J, et al. Regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channel RyR1 by S-Palmitoylation. *J Biol Chem*, 2014, 289: 8612–8619
- 6 Chen S Y, Ju H, Wang Y X. Advances in the bidirectional regulatory mechanisms of mitochondrial calcium homeostasis and ATP production (in Chinese). *Chin Anim Sci*, 2022, 58: 76–81 [陈思远, 琚昊, 王永侠. 线粒体钙稳态与ATP生成双向调节机制的研究进展. 中国畜牧杂志, 2022, 58: 76–81]
- 7 Roderick H L, Berridge M J, Bootman M D. Calcium-induced calcium release. *Curr Biol*, 2003, 13: R425
- 8 Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 517–529
- 9 Prakriya M, Lewis R S. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 2015, 95: 1383–1436
- 10 Slusarski D C, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol*, 2007, 307: 1–13
- 11 Jiang L H, Mousawi F, Yang X, et al. ATP-induced Ca^{2+} -signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 3697–3710
- 12 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154–156
- 13 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 14 Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2004, 431: 997–1002
- 15 Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, et al. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 774–786
- 16 Kim J H, Park S H, Park S G, et al. The pivotal role of reactive oxygen species generation in the hypoxia-induced stimulation of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 1753–1761
- 17 Le Belle, Janel E., Nicolas M Orozco, et al. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell*, 2011, 8: 59–71
- 18 Zhou S, Liang X, Sun Z, et al. MiRNA let-7i promotes radiation-induced pulmonary epithelial-mesenchymal transition by targeting IL-10. *Genome Instab Dis*, 2022, 3: 271–284
- 19 Greer E L, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 2005, 24: 7410–7425
- 20 Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J*, 2006, 25: 3515–3523
- 21 Tothova Z, Kolipara R, Huntly B J, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 2007, 128: 325–339
- 22 Miyamoto K, Araki K Y, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 101–112
- 23 Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 2010, 463: 676–680

- 24 Gan B, Sahin E, Jiang S, et al. mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 19384–19389
- 25 Chen C, Liu Y, Liu R, et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med*, 2008, 205: 2397–2408
- 26 Feeley K P, Adams C M, Mitra R, et al. Mdm2 is required for survival and growth of p53-deficient cancer cells. *Cancer Res*, 2017, 77: 3823–3833
- 27 Abbas H A, Pant V, Lozano G. The ups and downs of p53 regulation in hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*, 2011, 10: 3257–3262
- 28 Ahamad N, Sun Y, Singh B B. Increasing cytosolic Ca^{2+} levels restore cell proliferation and stem cell potency in aged MSCs. *Stem Cell Res*, 2021, 56: 102560
- 29 Cappuccio I, Spinsanti P, Porcellini A, et al. Endogenous activation of mGlu5 metabotropic glutamate receptors supports self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells. *Neuropharmacology*, 2005, 49: 196–205
- 30 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113: 643–655
- 31 Di Giorgi Gerevini V D, Caruso A, Cappuccio I, et al. The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Dev Brain Res*, 2004, 150: 17–22
- 32 Pałucha A, Brański P, Krocza B, et al. Developmental changes in the modulation of cyclic amp accumulation by activation of metabotropic glutamate receptors. *Pol J Pharmacol*. 2001, 53:481–486
- 33 Defagot M C, Villar M J, Antonelli M C. Differential localization of metabotropic glutamate receptors during postnatal development. *Dev Neurosci*, 2002, 24: 272–282
- 34 Todorova M G, Fuentes E, Soria B, et al. Lysophosphatidic acid induces Ca^{2+} mobilization and c-Myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase C pathway. *Cell Signal*, 2009, 21: 523–528
- 35 Kim J, Lengner C J, Kirak O, et al. Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem Cells*, 2011, 29: 992–1000
- 36 Neganova I, Zhang X, Atkinson S, et al. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*, 2009, 28: 20–30
- 37 Metcalfe S, Weeds A, Okorokov A L, et al. Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin. *Oncogene*, 1999, 18: 2351–2355
- 38 Jánossy J, Ubezio P, Apáti Á, et al. Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67: 1513–1521
- 39 Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, et al. On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett*, 1997, 406: 17–22
- 40 Zhang W, Lu Q, Xie Z J, et al. Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene*, 1997, 14: 255–263
- 41 Madreiter-Sokolowski C T, Thomas C, Ristow M. Interrelation between ROS and Ca^{2+} in aging and age-related diseases. *Redox Biol*, 2020, 36: 101678
- 42 Ying Z, Chen K, Zheng L, et al. Transient activation of mitoflashes modulates nanog at the early phase of somatic cell reprogramming. *Cell Metab*, 2016, 23: 220–226
- 43 Burtenshaw D, Kitching M, Redmond E M, et al. Reactive oxygen species (ROS), intimal thickening, and subclinical atherosclerotic disease. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6: 89
- 44 Ying Z, Xiang G, Zheng L, et al. Short-term mitochondrial permeability transition pore opening modulates histone Lysine methylation at the early phase of somatic cell reprogramming. *Cell Metab*, 2018, 28: 935–945.e5
- 45 Dionigi B, Ahmed A, Pennington E C, et al. A comparative analysis of human mesenchymal stem cell response to hypoxia *in vitro*: implications to translational strategies. *J Pediatr Surg*, 2014, 49: 915–918
- 46 Park I H, Kim K H, Choi H K, et al. Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e44
- 47 Lv Y H, Zhang F Y, Li G Y, et al. Research on mechanism of SIRT3/MnSOD/ROS in regulating osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells (in Chinese). *J Chongqing Med Univ*, 2023, 4: 875–881 [吕远航, 张廷蔚, 李广悦, 等. SIRT3/MnSOD/ROS参与调控脂肪源性干细胞成骨分化的机制研究. 重庆医科大学学报, 2023, 46: 875–881]

- 48 Khacho M, Clark A, Svoboda D S, et al. Mitochondrial dynamics impacts stem cell identity and fate decisions by regulating a nuclear transcriptional program. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 232–247
- 49 Leclerc C, Daguzan C, Nicolas M T, et al. L-type calcium channel activation controls the *in vivo* transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mech Dev*, 1997, 64: 105–110
- 50 Leclerc C, Webb S E, Daguzan C, et al. Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3519–3529
- 51 Drean G, Leclerc C, Duprat A M, et al. Expression of L-type Ca^{2+} channel during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol*, 1995, 39: 1027–1032
- 52 Leclerc C, Rizzo C, Daguzan C, et al. Neural determination in *Xenopus laevis* embryos: control of early neural gene expression by calcium. *J Soc Biol*, 2001, 195: 327–337
- 53 Hao B, Lu Y, Wang Q, et al. Role of STIM1 in survival and neural differentiation of mouse embryonic stem cells independent of Orai1-mediated Ca^{2+} entry. *Stem Cell Res*, 2014, 12: 452–466
- 54 Wang Y J, Huang J, Liu W, et al. IP3R-mediated Ca^{2+} signals govern hematopoietic and cardiac divergence of Flk1⁺ cells via the calcineurin-NFATc3-Etv2 pathway. *J Mol Cell Biol*, 2017, 9: 274–288
- 55 Tran T D N, Yao S, Hsu W H, et al. Arginine vasopressin inhibits adipogenesis in human adipose-derived stem cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 406: 1–9
- 56 Deng H, Gerencser A A, Jasper H. Signal integration by Ca^{2+} regulates intestinal stem-cell activity. *Nature*. 2015, 528: 212–217
- 57 Snoeck H. Calcium regulation of stem cells. *EMBO Rep*, 2020, 21: e50028
- 58 Storr S J, Carragher N O, Frame M C, et al. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 364–374
- 59 Wang Y, Zhang Y. Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep*, 2014, 6: 278–284
- 60 Zhang X, Su J, Jeong M, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat Genet*, 2016, 48: 1014–1023
- 61 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 486–541
- 62 Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 2007, 7: 367–373
- 63 Wang Z, Wei X, Zhang Y, et al. NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24: 619–626
- 64 Lewis K N, Wason E, Edrey Y H, et al. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3722–3727
- 65 Zhang J, Chen G H, Wang Y W, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J*, 2012, 125: 3472–3478
- 66 Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 2009, 461: 537–541
- 67 Borodkina A V, Shatrova A N, Deryabin P I, et al. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging*, 2016, 8: 3400–3418
- 68 Xie Y, Chen D, Jiang K, et al. Hair shaft miniaturization causes stem cell depletion through mechanosensory signals mediated by a Piezo1-calcium-TNF- α axis. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 70–85.e6
- 69 Zhou Y K, Yang R L, Liu X M. Hydrogen sulphide alleviates senescence of human periodontal ligament stem cells by TRPV4 channel mediated calcium flux. *Chin J Dent Res*, 2023, 26: 19–27
- 70 Chen Y, Qi H, Li X, et al. Suppressing effect of Ca^{2+} blips on puff amplitudes by inhibiting channels to prevent recovery. *Phys Rev E*, 2016, 94: 022411

Function and regulation of calcium ions and reactive oxygen species in pluripotent stem cells

HONG XueJun^{1,2}, FU JiangQin^{1,2}, LIN DongTong^{1,2}, ZHANG YiKai^{1,2}, DING HaoLin^{1,2},
TAN TianXin^{1,2}, LI QiuZhi^{1,2}, LI AnQi^{1,2} & LIU XingGuo^{1,2,3}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Guangdong-Hong Kong Joint Laboratory for Stem Cell and Regenerative Medicine, China-New Zealand Belt and Road Joint Laboratory on Biomedicine and Health, GIBH-HKU Guangdong-Hong Kong Stem Cell and Regenerative Medicine Research Centre, GIBH-CUHK Joint Research Laboratory on Stem Cell and Regenerative Medicine, GMU-GIBH Joint School of Life Sciences, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China;

2 Guangdong-Hong Kong-Macau Joint Laboratory for Cell Fate Regulation and Diseases, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

3 Centre for Regenerative Medicine and Health, Hong Kong Institute of Science & Innovation, Chinese Academy of Sciences, Hong Kong SAR 999077, China

Pluripotent stem cells have the characteristics of self-renewal and multidirectional differentiation potential, and are the research focus of regenerative medicine. The study of pluripotent stem cells is conducive to understanding physiological processes such as development and the pathogenesis of related diseases, and has important theoretical research value and clinical application prospect. Calcium ions (Ca^{2+}) and reactive oxygen species (ROS) are intracellular signaling molecules that play an important role in the fate regulation of stem cells. Under normal circumstances, the suitable ROS levels would maintain stem cell self-renewal and promote differentiation, but too high ROS levels would induce cell apoptosis. Ca^{2+} is involved in the maintenance of stem cell self-renewal in a variety of ways, including calcium-dependent cell signaling pathways, cell cycles, and epigenetic modifications, and calcium homeostasis, calcium signaling, and levels have a profound impact on the fate of various types of stem cells. These results are fundamental to advancing the field of stem cells, providing new opportunities and perspectives for the advancement of biomedical research and regenerative medicine. The function and regulatory role of Ca^{2+} and ROS in stem cells will continue to be a key focus of research and application. This article will discuss how ROS and Ca^{2+} regulate the fate of stem cells and the current research status, and look forward to the future development direction of this field.

reactive oxygen species, calcium ions, mitochondria, epigenetic inheritance, metabolism, pluripotency, differentiation, stem cell

doi: [10.1360/SSV-2023-0316](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0316)