

干细胞技术的研究热点领域与最新进展

熊 鹰, 余欢欢, 张龙威, 王 琦*

陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000

摘 要: 近两年在干细胞分离鉴定、诱导分化、重编程调控机制、可塑性与疾病治疗等方面取得了重大突破,使得干细胞技术从一种实验室概念逐渐转变成用于医学治疗的实际手段。本文分别从以上四个热点领域介绍了 2013-2014 年国内外干细胞的最新研究进展,并对干细胞研究中存在的问题进行了初步分析,为研究者提供参考。

关键词: 干细胞;研究热点;进展

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2014.04.05

Recent Research Advances and Focuses on Stem Cells

XIONG Ying, YU Huan-huan, ZHANG Long-wei, WANG Qi*

School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Shaanxi Hanzhong 723000, China

Abstract: In the past two years, scientists made breakthrough in stem cell isolation and identification, induced differentiation, reprogramming and regulation mechanism, plasticity and disease treatment, which making stem-cell technology gradually transform into practical means for medical treatment from a laboratory concept. This paper summarized the progress in stem-cell research from 2013 to 2014, and analyzed the existing problems in stem cell research, aiming at providing reference for researchers.

Key words: stem cells; research focus; recent research advances

干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源,因其具有高度自我复制、增殖和多向分化的潜能,而成为国际生物及医学领域关注的焦点^[1]。2012 年,英国科学家 John Gurdon 和日本科学家 Shinya Yamanaka 因在细胞核重新编程研究领域做出革命性贡献,而获得诺贝尔生理学或医学奖,干细胞技术突飞猛进。虽然干细胞的研究具有不可估量的医学价值和诱人的应用前景,但在干细胞诱导、分化调节机制等方面仍然存在不少问题。从 2013-2014 年国内外干细胞的最新研究进展来看,研究的热点领域涵盖了干细胞分离鉴定、诱导分化、重编程调控机制、可塑性与疾病治疗等方面。随着分子生物学技术的发展,基因组分析、单细胞测序等技术的运用,新发现的一些实验证据使以往的重要认识产生动摇甚至颠覆,干细胞研究领域的争论不断出现。而另一些新技术,如 3D 细胞培养技术,则加快了干细胞的实际应用。

1 干细胞的分离鉴定

干细胞的分离鉴定是研究干细胞生物学特性的基础,大量研究集中在对干细胞表面标志物和多向分化潜能的鉴定上。对不同组织来源的干细胞进行分离鉴定的一些结果表明,在干细胞分化和转归的方向上,其所处的微环境有着重要意义。Flesken-Nikitin 等^[2]在卵巢表面上皮细胞(ovarian surface epithelium, OSE)、间皮和输卵管上皮之间的过度或交界区域,确认了一个干细胞小生境,包含有癌症倾向的干细胞,能在排卵期修复受损的卵巢上皮细胞,而且很容易转化为肿瘤细胞。成体干细胞在两种上皮细胞之间的交界地区存在,这样的干细胞小生境易发生癌症。在其他器官,如子宫颈和肛门,类似的接合区域也可以包含癌症倾向的干细胞小生境,从而能够解释这些区域

收稿日期:2014-04-30; 接受日期:2014-05-23

作者简介:熊 鹰,本科,研究方向为生物科学。E-mail:1373950176@qq.com。* 通信作者:王 琦,副教授,硕士,主要从事动物保护及生理生态学研究。E-mail:wangqis6@163.com

恶变的易感性。这可能成为一个有吸引力的模式以进一步研究在交界区域的干细胞小生境能够执行上皮再生功能的分子和细胞机制,并且可能有助于了解卵巢癌等类似癌症的发病机制。

造血干细胞 HSC(hematopoietic stem cells)可大致分为偏向生成淋巴或骨髓血细胞的两种亚型,但是否存在其他偏好性的亚型,这些亚型在何种条件下产生并维持其偏好性,以及它们之间的相互关系等还不清楚。Sanjuan-Pla 等^[3]在小鼠体内鉴定出一种血小板偏好性造血干细胞,而且发现该 HSC 亚型可以组织成一个细胞层次,位于 HSC 细胞层次的顶端,主要分化为血小板,补充免疫系统的关键性血细胞。分离鉴定此类 HSC,分析其细胞标志物与标志物的变化,对于骨髓移植和化疗后造血功能重建很有意义。同时也提示在干细胞功能活跃的造血干细胞 HSC 中,干细胞所处的细胞层次可能影响其分化偏好性或者其分化偏好性影响了其聚类成不同的细胞层次。上述基于微环境差异分离鉴定特征性干细胞的研究有助于理解成体干细胞或造血干细胞的发生与作用机制。干细胞的分离鉴定不仅仅是干细胞研究的基础手段,更可为干细胞在诱导分化、重编程以及疾病治疗等方面的研究提供依据。

2 干细胞的诱导分化

干细胞诱导分化最近的研究集中在采用病毒转录因子、多聚嘧啶序列结合蛋白(poly pyrimidine tract binding protein,PTB)活性抑制、代谢调控或化学因子调控等方法来诱导干细胞的分化。Zhang 等^[4]利用逆转录病毒的 8 种转录因子,首次实现了将人类成纤维细胞直接转化为视网膜色素上皮样细胞的技术突破,为人类视网膜变性和老年性黄斑变性等视网膜退行性疾病的疾病模型、细胞治疗和药物筛选提供了新的途径。人为诱导分化需要解决分化细胞不同步、不均一以及潜在癌变风险的问题。Tohyama 等^[5]利用心肌细胞和未分化细胞的葡萄糖和乳酸代谢的显著差异,将多能干细胞(pluripotent stem cell,PSC)培养成为大量高纯度的心肌细胞,该方法比现有技术效率更高、成本更低,并且得到的心肌细胞几乎不存在癌化风险。体外诱导分化最直接的应用靶向于组织器官的构建与移植。Huang 等^[6]利用

化学因子成功地将人 iPS 细胞转化成了功能性的肺细胞和呼吸道细胞。模拟自然状态下的三维环境,能够较容易获得体外诱导培养困难的特异细胞类型。如,Xia 等^[7]利用人胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES)和 iPS 细胞(induced pluripotent stem cells,iPSc),经生长因子诱导培养成具有肾脏性质的中胚层细胞,再通过 3D 细胞培养技术,获得了与肾脏相似的三维组织结构,打破了只能人工诱导产生肾脏前体细胞的限制,为肾脏的构建提供了一个平台。此外,对造血干细胞转化为免疫细胞的时机有了新的认识,从而加深了对造血干细胞诱导分化的机制的理解。Zhao 等^[8]利用一种新型微流体技术证实,在感染存在条件下,造血干细胞能够直接将病原入侵信号转换为细胞因子信号,非常迅速地生成大量、多种细胞因子,并快速生成新免疫细胞,参与炎症反应。造血干细胞具有与其分化的免疫细胞相似的捕捉危险信号的能力,外源压力刺激通过信号转换来诱导干细胞分化,因此,有可能产生在细胞水平上的新的诱导分化方法。

3 干细胞重编程及其调控机制

重编程是指已分化细胞转化成具有分化能力的干细胞。Pereira 等^[9]将 4 个转录因子 Gata2、Gfi1b、cFos、Etv6 转入实验老鼠的成纤维细胞,制造出的一种类似人体造血干细胞的细胞类型,有望解决血液供给问题。Masaki 等^[10]用麻风杆菌感染小鼠雪旺细胞,发现该细菌对细胞进行了重编程,使其恢复到一种类似干细胞的未分化状态,再将其转变为肌样细胞,使得病菌感染得以扩散。雪旺细胞能够转变为修复细胞,帮助修复受损神经,细菌利用了这种细胞小生境的可塑性机制,通过分化相关基因的上调或下调,实现对成体细胞的重编程。

干细胞重编程受到细胞因子的调控,主要包括分化抑制因子和生长因子两类。通过对干细胞重编程及其细胞因子调控机制的研究,有利于高效而高量地制造用于医学治疗的干细胞。Frelin 等^[11]通过删除转录因子 GATA-3,发现 GATA-3 是 HSC 自我更新和分化的调节因子,并受 p38 信号通路的调控,对骨髓移植和基因治疗具有重要作用。Fan 等^[12]发现了激活的 Caspase-3 分子能

抑制脑内神经干细胞的再生,并揭示了其抑制机制,有利于脑卒中治疗。Brady 等^[13]发现利用小鼠 ES 细胞与人类成纤维细胞融合的异核体,能使重编程后的多能性更有效,而且用 IL-6 短暂培养细胞,可以不需 c-Myc 因子诱导,从而降低癌症基因的表达,使构建的 iPS 细胞更安全地用于疾病治疗。Wang 等^[14]研究发现,在 iPS 细胞诱导过程中,Sox2 能够在重编程的早期通过 NuRD 复合物,启动自噬调节,参与细胞的重编程。Schürch 等^[15]研究发现 CD8 和 T 细胞可以促使骨髓基质细胞细胞因子的释放,从而刺激造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC),达到调控人体自身防御机制的目的。Abad 等^[16]使用 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 四种诱导因子,在活鼠体内多个器官诱导形成畸胎瘤,证明了体内重编程的可行性,而且出现在血循环中的体内重编程 iPS 细胞的全能性比体外产生的 iPS 细胞要高,在转录水平上更接近于 ES,同时比 ES 处于更加原始的细胞状态,可塑性更强。这对于肿瘤的发生机制研究非常有价值。

4 可塑性与疾病治疗

干细胞在疾病治疗方面的研究主要集中在建立疾病模型、组织工程(器官诱导)、细胞治疗(肿瘤治疗)、药物筛选等领域,而干细胞的“可塑性”在这些领域中扮演了重要的角色。一些成体干细胞,如心肌干细胞、神经胶质干细胞等具有可塑性。研究干细胞微环境与干细胞的可塑性之间关系,结合重编程的分子机制的研究,应用于组织工程方面,可通过体内或体外诱导,初步获得心脏、肝脏、内耳等器官的类似结构。

4.1 可塑性

当将成体干细胞暴露于新环境时,它们会有很强的可塑性。干细胞的可塑性,是干细胞用于疾病治疗的关键。Ellison 等^[17]利用不同的弥散性心肌损伤造成的急性心力衰竭大鼠模型,发现受损的心肌细胞能通过心脏干细胞(cardiac stem cells, cSCs)再生恢复心脏功能,有望用于预防和治疗人类心力衰竭。Han 等^[18]将人体神经胶质祖细胞(glia progenitor cells, GPCs)植入小鼠体内,发现这些人体细胞能明显提高小鼠神经网络内的学习能力和可塑性,为医学界提供了一个了

解和治疗神经障碍的新工具。

4.2 组织工程与细胞治疗

目前,人类组织或器官受损治疗,主要依靠器官捐献,难以满足患者的需求,干细胞具有分化为不同组织或器官的能力,通过体外或体内诱导,获得人造器官,是解决医疗脏器问题的关键。干细胞所处的培养环境对其成功分化意义重大。组织原位能够激发多能干细胞分化潜能,使其分化出多种相关细胞类型来组织成功功能性器官。Lu 等^[19]将人类干细胞诱导分化的多能心血管祖细胞注入小鼠的脱细胞心脏,发现多能心血管祖细胞通过迁移,原位增殖并分化成心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞,重建了脱细胞的心,而且人造心脏组织具有自发收缩性,能产生机械力和药物应答,有望用于未来的器官移植和新药研发。联合多种分化潜能不同的细胞,可帮助组建起器官雏形。Takebe 等^[20]将人类 iPS 细胞与人类脐静脉内皮细胞、间充质干细胞共培养,形成了具有与人类肝脏功能相似的三维肝芽。还有许多研究倾向于采用更为简便和更有确定性的方法。如, Koehler 等^[21]使用三维细胞培养方法,诱导实验鼠的胚胎干细胞发育成了内耳的关键结构,有助于科学家们更好地理解内耳的发育过程,并构建出新的疾病模型,为听力损失和平衡失调寻找新的药物和疗法。Filareto 等^[22]结合遗传修复技术与细胞重编程技术,在小鼠模型中获得了能再生出肌肉的干细胞,可以用于治疗杜氏肌营养不良症。Themeli 等^[23]在已经成熟的肿瘤免疫细胞治疗技术,如 CAR-T 细胞治疗技术(chimeric antigen receptor modified T cells Therapy)中,采用 iPS 细胞生成了靶向 CD19 的 T 淋巴细胞,在移植瘤模型中,能够抑制小鼠肿瘤的生长,可用于肿瘤治疗。

5 干细胞研究中存在的问题

虽然干细胞技术已取得了重大的突破,但是仍面临许多方面的问题,影响干细胞技术的应用。

5.1 干细胞的培养

干细胞培养条件是干细胞技术的基础,干细胞常规培养对环境条件的要求极为苛刻,虽然已有研究者报道不用滋养层细胞和动物血清,简单

高效地培养 iPS 细胞,同时减少移植过程中引发感染风险的方法,但是简化、完善和规范培养条件仍然是科学家面临的一大难题^[24]。

5.2 伦理问题与 iPS 细胞的研究

自 1996 年克隆羊多利诞生以来,胚胎干细胞研究涉及到的伦理、宗教、道德、法律等问题,存在争议,严重阻碍了干细胞技术用于人类疾病治疗的发展。iPS 细胞实现将成熟体细胞诱导成具有分化潜能的干细胞,使得干细胞技术不再受制于 ES 细胞所面临的伦理问题。但由于 iPS 细胞的制备需通过病毒转染,且诱导效率一直比较低,重现性较差。陆续出现的其他 iPS 细胞的制备方法或改进,亦尚未有大的突破。iPS 细胞在诱导过程中积累的异常表观修饰是否会影响其多能性尚不清楚,仅有零星报道,Chang 等^[25]发现 *Zrsr1* 基因的低甲基化会导致 iPS 细胞的多功能性降低。

5.3 诱导分化的调节因子及机制

干细胞诱导的调节因子及其调控机制尚未清晰,要诱导产生某种类型的组织或器官,必须了解各种细胞因子的作用机制及其作用的时期^[26],否则可能获得功能不完善的器官或组织^[20]。此外,对于损伤修复中干细胞参与作用的机制与分化方向研究证据不足,心肌再生干细胞疗法的假阳性问题,以及 c-kit 阳性心肌干细胞在心机功能恢复中对心肌再生贡献^[27]引发的争议受到广泛关注。

5.4 定向诱导

体外或体内诱导干细胞分化成组织特异性细胞或者使体细胞经中胚层细胞状态转分化为其他细胞类型目前还存在很多不确定性,尤其对于肾脏、心脏等细胞谱系复杂的组织器官。采用干细胞治疗难以确保心脏祖细胞分化成功功能性心室心肌细胞,以及难以确保能将分化的细胞输送和集成到患者的心室肌中,很难定向形成组织或器官。

5.5 诱发肿瘤

Koyanagi-Aoi 等^[28]在诱导神经细胞时发现,混杂未分化细胞移植会导致肿瘤,在移植过程中,部分诱导细胞会表现出致肿瘤性。目前,使用的诱导因子有 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc,但有些诱导因子,如 c-Myc 虽然能够诱导干细胞的分化但使肿瘤的发生频率明显提高,其对人类干细胞可能具有致肿瘤性^[22,28]。

5.6 诱导器官或组织衰老

通过干细胞诱导获得的组织或器官,虽然在形态和结构上是新生结构,但是与其细胞核内遗传物质的衰老同步,用患者细胞诱导产生的器官或组织无法保证正常功能。

5.7 免疫排斥

干细胞疗法面临的瓶颈是移植后的免疫排斥。iPS 细胞的产生被认为解决了 ES 细胞存在的免疫排斥问题,但也有报道称 iPS 细胞诱发自身免疫反应。虽然细胞或器官移植后,可使用免疫抑制剂抑制排斥反应,但是长期使用免疫抑制剂有很大毒性及其他副作用^[29]。

为了实现干细胞治愈疾病的潜能,必须更加深入地了解调控干细胞的增殖与定向分化的分子机理,以便能够使干细胞技术更加安全、可控,减少诱导干细胞生成组织器官的衰老问题,降低癌变的风险等。干细胞基础理论与临床应用研究相互促进与融合有望加快干细胞临床应用的进程。

参 考 文 献

- [1] 朱丽华. 干细胞研究进展消息[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(2): 253-256.
- [2] Flesken-Nikitin A, Hwang C I, Cheng C Y, *et al.* Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche[J]. *Nature*, 2013, 495(7440): 241-245.
- [3] Sanjuan-Pla A, Macaulay I C, Jensen C T, *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy[J]. *Nature*, 2013, 502(7470): 232-236.
- [4] Zhang K, Liu G H, Yi F, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts into retinal pigment epithelium-like cells by defined factors[J]. *Protein Cell*, 2013, 5(1): 48-58.
- [5] Tohyama S, Hattori F, Sano M, *et al.* Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. *Cell Stem Cell*, 12(1): 127-137.
- [6] Huang S X, Islam M N, O'Neill J, *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 32(1): 84-91.
- [7] Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, *et al.* Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells[J]. *Nat. Cell Biol.*, 2013, 15(12): 1507-1515.
- [8] Zhao J L, Ma C, O'Connell R M, *et al.* Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(4): 445-459.
- [9] Pereira C F, Chang B, Qiu J, *et al.* Induction of a hemogenic program in mouse fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13

- (2):205–218.
- [10] Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, *et al.*. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by *Leprosy bacilli* promotes dissemination of infection[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 51–67.
- [11] Frelin C, Herrington R, Janmohamed S, *et al.*. GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells[J]. *Nat. Immunol.*, 2013, 14(10):1037–1044.
- [12] Fan W, Dai Y, Xu H, *et al.*. Caspase-3 modulates regenerative response after stroke[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2):473–486.
- [13] Brady J J, Li M, Suthram S, *et al.*. Early role for IL-6 signalling during generation of induced pluripotent stem cells revealed by heterokaryon RNA-Seq[J]. *Nat. Cell Biol.*, 2013, 15(10):1244–1252.
- [14] Wang S, Xia P, Ye B, *et al.*. Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(5): 617–625.
- [15] Schürch C M, Riether C, Ochsenbein A F. Cytotoxic CD8⁺ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(4):460–472.
- [16] Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, *et al.*. Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features[J]. *Nature*, 2013, 502(7471):340–345.
- [17] Ellison G M, Vicinanza C, Smith A J, *et al.*. Adult c-kit^(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair[J]. *Cell*, 2013, 154(4):827–842.
- [18] Han X, Chen M, Wang F, *et al.*. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 342–353.
- [19] Lu T Y, Lin B, Kim J, *et al.*. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells[J]. *Nat. Commun.*, 2013, 4:2307.
- [20] Takebe T, Sekine K, Enomura M, *et al.*. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant[J]. *Nature*, 2013, 499(7459):481–484.
- [21] Koehler K R, Mikosz A M, Molosh A I, *et al.*. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture[J]. *Nature*, 2013, 500(7461):217–221.
- [22] Filaretto A, Parker S, Darabi R, *et al.*. An *ex vivo* gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells[J]. *Nat. Commun.*, 2013, 4:1549.
- [23] Themeli M, Kloss C C, Ciriello G, *et al.*. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(10): 928–933.
- [24] Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, *et al.*. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells[J]. *Sci. Rep.*, 2014, 4: 3594.
- [25] Chang G, Gao S, Hou X, *et al.*. High-throughput sequencing reveals the disruption of methylation of imprinted gene in induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Res.*, 2014, 24(3): 293–306.
- [26] Takasato M, Er P X, Becroft M, *et al.*. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney[J]. *Nat. Cell Biol.*, 2014, 16(1): 118–126.
- [27] van Berlo J P, Kanisicak O, Maillet M, *et al.*. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart[J]. *Nature*, 2014, 509(7500):337–341.
- [28] Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, *et al.*. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(5): 20569–20574.
- [29] Rong Z, Wang M, Hu Z, *et al.*. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1):121–130.