

间充质干细胞临床应用的前景与困惑

瞿海龙, 边剑飞, 张冰, 王颖, 周英莲

(河北大学附属医院 急诊科, 河北 保定 071000)

摘要: 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 目前已用于移植抗宿主反应、心力衰竭、成骨不全、脊髓损伤等临床疾患, 且已取得满意的临床效果。然而, 随着研究的深入, MSCs的负面效应, 如促进肿瘤增长及转移、使肿瘤细胞产生抗药性、本身恶变等受到更多学者的广泛关注。现就MSCs临床应用的利与弊作一综述。

关键词: 间充质干细胞; 分化; 肿瘤

中图分类号: R 542.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-490X(2011)05-0072-04

MSCs是一种非均质、具有多向分化潜能的干细胞, 在特定的诱导条件下能够分化为中胚层起源的各类细胞, 如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞等^[1]。MSCs已用于治疗晚期扩张型心肌病、软骨病、中风、自身免疫性疾病等, 且取得了满意的临床疗效。然而, 随着对MSCs研究的深入, 其负面效应亦引起更多学者的关注, 如MSCs可促进癌症的发生, 尤其是血液系统恶性肿瘤的发生。有研究显示, MSCs可加速肿瘤生长、迁移, 本身在体外亦可发生恶变, 使其临床应用的安全性受到质疑^[2]。现就MSCs临床应用的前景及困惑综述如下。

1 MSCs的生物学特点

20世纪60年代, Friedenstein等^[3]首次从骨髓中提取到一类可贴壁生长、成纤维样细胞, 此类细胞在体外可自我增殖, 并向成骨细胞、软骨细胞分化, 将其命名为间充质干细胞。随后有研究者从其他组织 (脂肪组织、脐带血、胎盘、骨实质、肌肉、胰腺、肺脏等) 中也分离获得了MSCs。MSCs具有一些共同的表型特征, 但没有一种为其所特有。根据国际细胞疗法协会的标准, 人类MSCs在标准培养条件下必须满足以下条件^[4]: (1) 此类细胞必须贴壁生长; (2) 必须表达CD₁₀₅、CD₇₃、CD₉₀分子, 不表达CD₄₅、CD₃₄、CD₁₄、CD_{11b}、CD₇₉和表面分子HLA-DR; (3) 此类细胞必须能够分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。然而, 这些标准并非精确, 因为MSCs表面分子的表达可受到外源性因素的调控, 且体外表达与体内表达也不尽相同, CD₄₄、CD₇₁、Stro-1、CD₁₀₆、CD₁₆₆、CD₂₉在MSCs表面时有表达, 亦可作为其表面分子特征。

骨髓MSCs具有易于获取、体外易培养的特点, 使其研究最为深入。目前, 用于分离骨髓MSCs的方法主要有两种^[5]: 贴壁筛选法和密度梯度分离法。贴壁筛选法根据MSCs可粘附在培养瓶上贴壁生长的特性, 将抽取的骨髓细胞直接贴壁培养, 经多次换液后去掉未贴壁细胞。该方法分离后所得的MSCs纯度不高。最常用的是密度梯度分离法, 将抽取的骨髓利用分离液离心, 收集位于分离液和悬浮液界面的单个核细胞层培养, 通过换液和传代纯化MSCs。

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 瞿海龙(1976—), 男, 河北涞水人, 主治医师, 硕士。E-mail: hailongju1976@sohu.com

2 MSCs在临床上的应用

MSCs的特点就是多向分化潜能, 确定MSCs标准之一就是能够分化为骨、软骨和脂肪细胞。此外, MSCs在适当诱导条件下, 还可分化为骨骼肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、神经元细胞和胰腺 β 细胞。MSCs是一类低免疫原性细胞, 其低表达主要对组织相容性复合体-1 (major histocompatibility complex-1, MHC-I) 类分子, 不表达MHC-II类分子。MSCs缺乏共刺激分子CD₄₀、CD₈₀和CD₈₆的表达, 尽管MHC-I类分子低表达可激活T细胞, 但由于缺乏共刺激分子, 无法启动免疫应答第二信号, 使T淋巴细胞处于无变应状态。同时, MHC-I类分子低表达可使MSCs免受自然杀伤细胞介导的细胞毒反应。因此, MSCs在体内可逃避免疫选择而长期生存。

MSCs在细胞治疗和组织工程学中备受研究者关注, 除与其具有多向分化潜能和免疫耐受有关外, 尚有其他原因。首先, 与其他类型干细胞相比, MSCs易于获取和体外培养, 且无伦理学限制。此类细胞可在体外扩增15代而保持原代细胞的生物学特点, 无自发分化倾向; 其次, MSCs可分泌多种生长因子与细胞因子, 具有细胞定向趋化、营养和再生血管等作用。

1995年, Lazarus等^[6]首次将自体MSCs经静脉途径移植到15例血液系统恶性肿瘤患者体内, 并对细胞治疗的安全性进行评估。其研究表明, MSCs移植是安全可行的, 所有患者均得到完全缓解。随后, Horwitz等^[7]应用MSCs治疗儿童成骨不全症, 结果显示, MSCs移植可减少这些儿童的骨折频率。目前MSCs已用于治疗免疫疾患、心脏疾患和脊髓损伤。2004年, Le Blanc等^[8]应用MSCs成功治愈1例9岁激素难治性IV级急性移植抗宿主病患者, 在其随后的研究中, 又有6例此类患者得到彻底的治愈。MSCs治疗缺血性心肌病取得了令人鼓舞的成绩, 然而其临床疗效目前认为多源于MSCs的旁分泌效应, 而并非最初认为的MSCs向心肌细胞的分化^[9]。也有研究^[10]显示, 应用MSCs与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子可促进急性和亚急性脊髓损伤, 然而对脊髓慢性损伤无明显疗效。

脂肪组织来源的MSCs或脂肪组织来源的干细胞 (adipose tissue-derived stem cells, ASDCs) 也备受众多学者关注。与其他组织来源的MSCs相似, 此类细胞亦具有多向分化潜能, 已用于椎间盘的修复、脊髓损伤、中风、糖尿病、风湿性关节炎等的治疗。Garcia-Olmo等^[11]应用ASDCs治疗克罗恩氏病的复杂性肛瘘, 研究显示, ASDCs结合注射纤维蛋白胶, 比单纯纤维蛋白胶治疗明显提高了疗效。其他类型MSCs, 如肌源性MSCs目前也处于临床研究阶段。尽管MSCs可从骨髓中获取, 但骨穿取材疼痛明显, 具有侵袭性, 而骨骼肌活检只需在局麻下应用细穿刺针即可完成。肌源性MSCs已用于治疗肌骨骼疾病和尿失禁^[12]。

3 MSCs临床应用的风险

尽管MSCs已用于多种疾患的治疗, 然而这类细胞被发现具有多项负面效应, 尤其是直接和间接参与了癌症的发生。

关于MSCs对肿瘤的调节作用一直存在争议。有研究认为, MSCs可抑制肿瘤的生长, 而有研究显示, MSCs具有肿瘤保护作用, 可抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤增长及迁移, 增强癌细胞的药物抵抗。尽管众多试验表明, MSCs可抑制癌细胞的增殖, 然而其往往伴随着抗凋亡效应。Ramasamy等^[13]报道MSCs可抑制造血细胞和非造血细胞源性恶性肿瘤的增殖与凋亡, 并使肿瘤细胞停止在G₁期, 当肿瘤细胞与MSCs一起注入到体内, 肿瘤的生长速度明显快于单独注入的肿瘤细胞。Li等^[14]研究显示, 人MSCs对肿瘤细胞的生长在体内与体外具有双重作用, 在体外人MSCs抑制A549(肺癌)和Eca-109(食管癌)增

殖,使肿瘤细胞处于G₁期,促进其凋亡。在体内人MSCs能够促进肿瘤形成和生长。

MSCs除具有抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤生长外,还与肿瘤细胞的转移密切相关。最近研究显示, MSCs能够定向趋化于肿瘤原发灶和转移灶,在局部分泌炎症趋化因子,可促进肿瘤细胞发生肺转移,且与乳腺癌的发生具有显著相关^[15]。此外, MSCs可促进肿瘤细胞对化疗药物产生药物抵抗。Kurtova等^[16]实验表明, MSCs可抑制氟达拉滨、地塞米松及环磷酰胺诱导的慢性淋巴细胞性白血病细胞的凋亡。Vianello等^[17]研究显示,骨髓来源的MSCs可抑制伊马替尼诱导的慢性粒细胞白血病细胞的凋亡,其干预机制是通过CXCR4/CXCL12轴进行的,如能够中断此途径,即可恢复白血病细胞对伊马替尼的敏感性。

MSCs本身也具有恶变的风险,通常发生在以下3种情况: MSCs在体外扩增阶段; MSCs与肿瘤间质相互作用阶段; MSCs基因操作导致此类细胞恶变。

临床上为了获得足够的MSCs,必须在体外进行大量扩增,这种多次传代易导致MSCs发生恶变。2005年, Rubio等^[18]首次报道脂肪组织来源的MSCs在体外经长期扩增可产生不死性,并自发性恶变。在其随后的研究中表明,此类细胞通过上调c-myc的表达、抑制P16水平、获得端粒酶活性、InK4a/Arf位点缺失、Rb磷酸化使其获得长期生存特性。此外,线粒体代谢调控、DNA损伤修复蛋白和细胞周期调控因子在细胞恶变中起到一定作用。

MSCs具有归巢到肿瘤细胞的特性,这种归巢作用不仅可促进肿瘤生长,而且可使MSCs在肿瘤部位发生恶变。将MSCs置于肿瘤生长环境中,这些细胞能够分化为癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)或肿瘤相关成纤维细胞(tumour-associated fibroblasts, TAF), CAF和TAF是肿瘤的重要组成部分,有利于肿瘤纤维血管网的扩张和肿瘤增长^[19]。

为了提高MSCs的临床疗效,目前多采用病毒或非病毒载体对其进行基因转染。然而这些基因操作存在着众多风险和不利,如转基因可能为致瘤基因、转基因位点的插入使MSCs基因组发生断裂等,均可导致MSCs发生恶变。Takeuchi等^[20]研究显示,转基因MSCs体外培养可导致线粒体不稳定,具有自发癌病的危险。

总之, MSCs在临床应用中已取得令人振奋的成绩,但如何避免其负面效应的发生,尤其是恶性肿瘤的发生,将会是以后MSCs研究的重点。

参考文献:

- [1] 瞿海龙,麻晓静,张冰. 干细胞治疗自身免疫性疾病和心脏疾患的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2011, 28(2): 81-84.
- [2] PATEL S A, MEYER J R, GRECO S J, et al. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- β [J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184(10): 5885-5894.
- [3] FRIEDENSTEIN A J, PIATETZKY-SHAPIRO I I, PETRAKOVA K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1966, 16(3): 381-390.
- [4] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the international society for cellular therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [5] 瞿海龙,彭广军,麻晓静,等. 骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死的困惑与争议[J]. 医学研究与教育, 2009, 26(6): 74-76.
- [6] LAZARUS H M, HAYNESWORTH S E, GERSON S L, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 1995, 16(4): 557-564.
- [7] HORWITZ E M, PROCKOP D J, FITZPATRICK L A, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived

- mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(3): 309-313.
- [8] LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells[J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441.
- [9] 瞿海龙. 骨髓间充质干细胞治疗心力衰竭研究进展[J]. *河北职工医学院学报*, 2008, 25(6): 78-79.
- [10] YOON S H, SHIM Y S, PARK Y H, et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: phase I/II clinical trial[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(8): 2066-2073.
- [11] GARCIA-OLMO D, HERREROS D, PASCUAL I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial[J]. *Diseases of the Colon Rectum*, 2009, 52(1): 79-86.
- [12] CARR K, STEELE D, STEELE S, et al. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence[J]. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction*, 2008, 19(6): 881-883.
- [13] RAMASAMY R, LAM E W, SOEIRO I, et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth[J]. *Leukaemia*, 2007, 21(2): 304-310.
- [14] LI Lin, TIAN Hui, YUE Weiming, et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(7): 1860-1867.
- [15] KUCEROVA L, MATUSKOVA M, HLUBINOVA K, et al. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells[J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9(1): 129.
- [16] KURTOVA A V, BALAKRISHNAN K, CHEN R, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance[J]. *Blood*, 2009, 114(20): 4441-4450.
- [17] VIANELLO F, VILLANOVA F, TISATO V, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis[J]. *Haematologica*, 2010, 95(7): 1081-1089.
- [18] RUBIO D, GARCIA-CASTRO J, MARTÍN M C, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(8): 3035-3039.
- [19] SPAETH E L, DEMBINSKI J L, SASSER A K, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): 4992.
- [20] TAKEUCHI M, TAKEUCHI K, KOHARA A, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007, 43(3/4): 129-138.