

• 综述 •

老年成体干细胞的研究现状

王宇政 综述 张浩 审校

干细胞是一类具有不同分化潜力的细胞群体的总和^[1]。干细胞存在于整个生命过程中,根据其发育阶段,干细胞分为胚胎干细胞(embryonic stem cell)和成体干细胞(adult stem cell),胚胎干细胞的增殖和分化是个体发育的基础,而成体干细胞的增殖和进一步分化则维持个体组织细胞损伤的修复和再生。成体干细胞的增生和分化潜能,是目前生物学界和医学界关注的热点,被作为组织再生和重建的重要资源。尽管用干细胞治疗各种疾病的尝试已陆续从基础研究迈向临床实践,但是目前仍存在着众多尚未澄清的理论问题,限制了干细胞的广泛应用和纵深发展。老化的成体干细胞的细胞状态就是其中的突出问题之一。

1 关于老化

干细胞的老化涉及到两个方面:一是指在体细胞随机体的衰老而发生相关改变(*in vivo aging*),细胞状态随整体而变化,是整体衰老的一部分。这种衰老多由遗传特性决定,如端粒长度、端粒酶活性以及一些基因如p53和RB抑癌基因的状态等等;同时也受到局部环境因素的影响,如局部不断反复出现的病理过程:炎症反应、氧化自由基、持续的促分裂刺激等,这些刺激在细胞内不断蓄积而致局部细胞的衰亡^[2,3]。细胞衰老的另一方面是指离体细胞在体外培养过程中逐渐发生的停止增殖,细胞在各种因素作用下逐渐丧失了完整的自我繁殖及自我修复的功能^[4],属于细胞本身的衰老(*cellular senescence, in vitro aging*),此种情况基本不受机体的遗传情况控制。两种老化的方式虽然从理论上有所不同,但是实际上相互渗透,互为因果,无法截然分开。在体内的衰老细胞可以被检测到表达不断增

强的细胞衰老的标记^[5],取自衰老个体的细胞在体外进行研究时表现为对体外环境的适应性与耐受性减退,过早过快出现生长停滞。同时,在体的细胞也会在局部各种因素的不断刺激下发生增殖减低,修复能力下降,类似于体外的衰老过程,表现出体外衰老的一些特点,这些损害多发于血管内皮、皮肤等部位,这里局部细胞的衰老的标志就更加明显。目前的研究手段大多只能从体外培养的过程中判定细胞的变化,从而间接推断评估细胞在体的功能,而对数量极少而且分布散在的干细胞的功能评价尚无特异性和敏感的可靠手段。

1.1 造血干细胞相关的研究 造血干细胞是人类最先认识并进行临床应用的一类干细胞。临床骨髓移植过程中,干细胞的数量和分化增殖潜能与移植后的效果密切相关^[6]。体外研究发现,衰老机体的造血干细胞克隆形成能力较年轻机体的明显下降,比较C57BL/6大鼠的CBA胚胎肝造血干细胞与成年大鼠的骨髓造血干细胞,前者的增殖能力明显强于后者;尽管如此,由于造血干细胞的分化和增殖潜力远高于一般的其他体细胞,整体的生存和功能远远超过生命本身的长度,因此即使存在着个体发生的老化,但对造血本身甚至造血移植并不构成严重影响。在体研究中,De Haan等^[6]发现老年C57BL/6大鼠比年轻大鼠含有更多造血干细胞,因此推测老化的造血干细胞数量增多很可能是一种对其增殖分化能力下降的代偿,从而在整体功能上不表现出明显的差异。但Liang等^[7]的研究显示,老年造血干细胞的数量和移植后的克隆形成能力与年轻大鼠无差异,只是在克隆形成效率和时相上明显延迟于年轻大鼠。这种差异反应在不同年龄个体的骨髓移植时,老年大鼠外周血各个系统的恢复较年轻者有所延迟,或者在应激反应中老年个体的恢复时间延长。

1.2 间充质干细胞的研究 间充质干细胞的一个重要特征是它能够向多种中胚层组织分化,如骨骼、软骨、脂肪、滑膜、肌肉、心肌组织等^[8]。这一特性使间充质干细胞成为目前干细胞研究领域的热点,人们从细胞的形态、增殖、分化、衰老标记等几个方面

收稿日期:2006-07-03

作者单位:100037 北京市,解放军总医院第一附属医院急救部(王宇政);210037 北京市,北京市阜外心血管病医院再生医学研究室(张浩)

作者简介:王宇政,女,1964年11月生,浙江镇海人,医学博士,副主任医师,急救部副主任。E-mail:rose3042002@yahoo.com.cn

开展对间充质干细胞的功能研究。间充质干细胞存在于多个组织中,以骨髓最多,而骨髓同时也是研究取材最为方便的器官。

1.2.1 形态 各种体外研究发现,间充质干细胞在培养过程中,逐渐出现一系列细胞老化的改变:单纯的纤维状梭形细胞的比例逐渐减少,而多角形、星形细胞的比例逐渐增加,细胞扁平,核变大,体积明显增大,触角增多,胞浆变多而且充满细小的颗粒甚至空泡,折光度差,黏附能力增加^[9],这些与一般的细胞老化的形态变化相同。而取自老化机体的骨髓间充质干细胞衰老干细胞的比例较年轻个体的干细胞比例略多,且在体外培养的过程中,这一变化出现更早更快。二者在时间及速度上的差异反映了取材的基础和背景不同,即为间充质干细胞的年龄差异的一种表现。

1.2.2 细胞的增殖潜能 细胞在体外培养过程中的传代次数反应了细胞的增殖能力。Baxter 等^[9]的研究显示,取自老化个体的骨髓间充质干细胞在体外传代的次数明显低于年轻个体;老年人的骨髓干细胞平均传代 16.7 次,而年轻者平均可传代到 28 次,用细胞形成的克隆(CFU-F)来评价干细胞的增殖能力^[10],老年小鼠或大鼠的骨髓间充质干细胞 CFU-F 形成数量减少,克隆体积也小,但也有少部分研究未发现二者之间存在差异。Ryu 等^[11]研究雄性小鼠的生精细胞,发现随着年龄的增长,生精细胞产生精子的能力逐渐降低,但如把这些生精细胞移植到年轻小鼠的睾丸中,他们的生精能力可以恢复并保持 3 年以上,远远超过这些小鼠本身的寿命,提示生精细胞的衰老与环境密切相关。干细胞与生精细胞多有相似之处,因此推测干细胞的衰老过程中,环境也起着至关重要的作用。

1.2.3 细胞的分化潜能 分化能力是干细胞的重要性质,有人推测成体干细胞的分化潜能随年龄增加而下降。许多研究结果显示成年的干细胞骨骼分化潜能确呈现出随增龄而减低之趋势,但是结论不一。Shi 等^[12]比较不同年龄段兔的脂肪间充质干细胞的骨骼分化能力,未发现年龄之间的差异。Bonab 等^[13]的研究显示,骨髓间充质干细胞向脂肪转化的能力反而随着年龄增加。Muraglia 等^[14]对 185 个人骨髓间充质干细胞进行分化分析,结果显示干细胞的单项分化能力未存在年龄差异,但是双向或者三项分化潜能,年轻的干细胞要强于老者。

2 干细胞中的老化相关标志

2.1 端粒和端粒酶 端粒是真核细胞染色体末端

的特定 DNA 序列及相关蛋白质组成的复合物,依赖一种特殊的逆转录酶端粒酶。端粒长度受遗传因素影响,属于遗传衰老的范畴(aging)。端粒酶在一定程度修复不断损失的端粒末端序列,其活性在肿瘤细胞中最强,在精子、胚胎干细胞中也较强,同时还在一些组织干细胞中检测得到:造血干细胞、神经干细胞、皮肤干细胞、小肠干细胞等,一旦细胞发生分化,其活力就会明显下降。Baxter 等^[9]在体外培养人骨髓干细胞的过程中监测到端粒缩短现象,缩短速度与体细胞大致相同。Parsch 等^[15]体外研究人的软骨前体细胞和骨髓间充质干细胞的端粒长度和端粒酶活性,发现两种干细胞的端粒酶活性均较低,端粒长度随年龄变化并不显著。Flores 等^[16]研究小鼠表皮干细胞,发现其端粒的长度和端粒酶的活性影响着表皮干细胞的增殖、迁移和分化。骨髓干细胞的端粒酶活性检测目前结果不一致:有些可以检测到,而有些不能,其原因可能有二:一是检测手段的敏感性不同;二是具有端粒酶活性的干细胞仅占干细胞群体的极少部分,目前的手段尚不足以检测出此类极少量细胞。因此虽然端粒和端粒酶活性是作为评价体细胞衰老和增殖活性的指标,但使用它来评估干细胞尚不够精确和成熟。

2.2 p53 基因 p53 是抑癌基因的一种,最近的研究发现与衰老密切相关^[17]。有对干细胞的研究显示,老化的干细胞 p53 表达增加。Stolzing 等^[18]对第 3 周和第 56 周大鼠的干细胞进行对比研究,结果后者的 p53 基因阳性细胞多于前者。目前认为,p53 的活性和状况除遗传背景之外还有多种因素的调解,是一种在体衰老和体外复制性损伤以及各种刺激的共同靶点和途径,反映了体内外综合因素,因此单独 p53 基因尚不能作为确定和判断衰老的独立指标。

2.3 β-半乳糖(β-GAL) pH 为 6 时 β-半乳糖的活性被认为是细胞衰老的标志之一,主要反应细胞在体外衰老和衰退的情况。Vacanti 等^[19]用新鲜采集的骨髓间充质干细胞检测 β-半乳糖,尚未发现年轻与年老者之间有差异,但随着培养时间的延长阳性率逐渐增加。在体外,失去了细胞周围间质的保护和缓冲,各种损伤的积累造成了溶酶体活性的逐渐增加。但是用它来反映机体内部细胞的状态尚不成熟。

3 老化骨髓间充质干细胞移植研究

用取自衰老人体的干细胞进行移植研究,观察移植后组织再生和恢复的效果,是评价干细胞功能

的另一个重要方面。Schattner 等^[20]的研究发现,取自老年小鼠的间充质干细胞移植后伤口愈合中的血管密度和数量受到某种程度的抑制,而取自少年小鼠的骨髓干细胞移植后伤口局部血管密度明显增加,伤口面积明显缩小。张浩等^[21]比较了衰老和青年大鼠的骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死模型的效果,发现衰老大鼠干细胞移植后局部的血管密度无明显减少,但是移植后心脏功能的恢复明显差于年轻的干细胞。Dressler 等^[22]分别用青年及老年兔的骨髓干细胞移植进行肌腱损伤后的修复比较,未发现二者存在差异。Liang 等^[7]用年轻和老年C57BL/6的骨髓细胞对Ly5小鼠进行移植比较,发现老年干细胞移植后形成克隆的大小虽然相同,但是数量较年轻的低,而且造髓的作用明显延迟,表现在外周血象各项指标的恢复也相应延迟。

总之,从生物的发育生长角度,干细胞不可避免地存在着老化。老化的干细胞从增殖潜能,分化潜力和移植后功能改善上都显示出某种程度功能欠缺。这些可以受机体遗传及生存背景的控制,也与长期生存过程中各种体内局部刺激及损伤的蓄积有关。但是这一结论仅为倾向性认识,尚未达成共识。随着研究手段的不断进步,衰老后机体干细胞的变化终会为人们所认识和利用。

参 考 文 献

- [1] Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol*, 2005, 40: 926-930.
- [2] Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 2005, 120: 513-522.
- [3] Erusalimskya JD, Kurzb DJ. Cellular senescence *in vitro*: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol*, 2005, 40: 634-642.
- [4] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res*, 2006, 5: 91-116.
- [5] Kammenga LM, De Haan G. Cellular memory and hematopoietic stem cell aging. *Stem Cells*, 2006, 24: 1143-1149.
- [6] De Haan G, Van Zant G. Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood*, 1999, 93: 3294-3301.
- [7] Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2005, 106: 1479-1487.
- [8] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004, 8: 301-316.
- [9] Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, et al. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells*, 2004, 22: 675-682.
- [10] Liu L, DiGirolamo CM, Navarro PA, et al. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2004, 294: 1-8.
- [11] Ryu BY, Orwig KE, Ostley JM, et al. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2006, 24: 1505-1511.
- [12] Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, et al. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 116: 1686-1696.
- [13] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol*, 2006, 7: 14.
- [14] Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 2000, 113: 1161-1166.
- [15] Parsch D, Fellenberg J, Brummendorf TH, et al. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med*, 2004, 82: 49-55.
- [16] Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 2005, 309: 1253-1256.
- [17] Kirkwood TB. p53 and ageing: too much of a good thing? *Bioessays*, 2002, 24: 577-579.
- [18] Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell*, 2006, 5: 213-224.
- [19] Vacanti V, Kong E, Suzuki G, et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol*, 2005, 205: 194-201.
- [20] Schattner GC, Ma N. Old bone marrow cells inhibit skin wound vascularization. *Stem Cells*, 2006, 24: 717-721.
- [21] 张浩, 胡盛寿, 郑哲, 等. 高龄和青年大鼠骨髓间质细胞移植对缺血心脏心功能的影响. 中华心血管病杂志, 2004, 32: 359-361.
- [22] Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J Orthop Res*, 2005, 23: 287-293.