评述

军事医学科学院干细胞与再生医学研究回顾与展望

军事医学科学院

收稿日期: 2011-07-20; 接受日期: 2011-08-18

doi: 10.1360/052011-598

摘要 干细胞具有高度自我更新、增殖和多向分化潜能, 因而成为再生医学的基础. 作为中国干细胞研究与应用的“先驱”单位和优势单位之一, 我院早期开展造血干细胞生物学性能、造血调控机制、造血干/祖细胞扩增和定向诱导分化的研究, 取得了一系列重要成果. 相继开展的造血干细胞移植等系列研究和应用也取得了突出的成绩. 近年来, 我院又系统开展了胚胎干细胞自我更新与干性维持机制、干细胞增殖分化调控、干细胞建系与建库技术、造血发育调控与造血干细胞移植新策略、成体干细胞治疗、肿瘤干细胞筛选与鉴定、干细胞为种子细胞的三维组织构建、干细胞再生相关药物等多个领域的研究, 并取得突出进展. 进一步我们将瞄准干细胞与再生医学的重大科学问题和关键技术, 建立高水平的研究和应用基地, 形成我院干细胞与再生医学研究开发的关键技术体系, 研发系列具有自主知识产权的关键技术和产品, 并培养优秀的科研团队, 进入世界先进行列.

关键词干细胞
发育调控
干细胞临床治疗
再生医学

干细胞具有高度自我更新、增殖和多向分化潜能、可植入性和具备重建能力等特征, 因而成为再生医学中备受关注的领域和再生医学的基础. 这些细胞既可以通过细胞分裂维持自身细胞群的稳定, 同时又可以进一步分化成为各种不同的组织细胞, 从而构成机体各种复杂的组织器官. 近年来, 干细胞技术、克隆技术和细胞重编程技术等一系列技术和理论的突破, 使得人类有可能在体外培养某些干细胞, 定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞以供临床治疗所需; 或通过细胞因子、以及各种化学物质和信号分子, 激活体内处于静止期或休眠状态的干细胞, 使其活化、增殖、分化、迁移, 从而修复或再生损伤或功能障碍的组织器官; 也可以作为“种子”细胞用于组织工程化器官的构建. 以此为目的的干细胞与再生医学研究涉及人体所有的组织和器官, 也涉及人类面临的大多数医学难题, 如心血管疾病、糖尿病、

帕金森病、癌症、早老性痴呆、自身免疫性疾病、严重烧伤、脊髓损伤、遗传性疾病、骨质疏松等. 其研究和应用将在细胞治疗、组织器官移植、基因治疗、基因组与蛋白质组研究、系统生物学研究、发育生物学模型、新药开发与药效、毒性评估等领域产生重要影响. 其一系列的技术突破使人们相信, 这一技术的研究与应用将成为现代医学中一类全新的治疗手段或新型“药物”, 它标志着医学将走出组织/器官匮乏的困境和牺牲健康组织为代价的“拆东墙补西墙”模式, 步入制造和再生组织器官的“再生医学”新时代. 因此, 干细胞的研究已经成为衡量一个国家生命科学与医学发展水平的重要指标. 除在科学和技术领域的重大理论意义与应用价值外, 还由于胚胎干细胞来源、人/动物细胞核移植、人类生殖性克隆等涉及人类生命伦理的问题而引起政府、科学界和公众的高度关注.

引用格式: 军事医学科学院. 军事医学科学院干细胞与再生医学研究回顾与展望. 中国科学: 生命科学, 2011, 41: 827-831, doi: 1360/052011-598

干细胞研究技术包括干细胞发育调控技术、胚胎干细胞建系与建库技术、治疗性克隆或体细胞核移植(SCNT)技术、细胞重编程与诱导性多能干细胞(iPS细胞)技术、干细胞治疗技术、肿瘤干细胞筛选与鉴定技术、干细胞为种子细胞的组织工程技术、干细胞相关的基因治疗技术、干细胞研究相关的非人灵长类动物模型制备技术、以及组织器官再生相关药物等多个交叉学科领域,并且在基因与蛋白质功能研究、生物信息学、发育生物学、生物反应器、药物筛选及功能和毒性评价等领域均扮演十分重要的角色,也是我国生命科学自主创新和学科交叉的新生长点,将带动以再生医学为代表的新型生物医药技术和产品的发展,具有巨大的社会和经济效益。

作为我国干细胞研究与应用的“先驱”单位和优势单位之一,早在20世纪70年代,我院就在全率先开展了造血干/祖细胞检测、造血干细胞生物学性能、造血干细胞辐射损伤效应、造血微环境等系列研究,并取得了一系列突出的成绩。之后,又相继开展了造血生长因子、造血基质细胞等调控造血及其相关机制的研究,以及骨髓移植等应用研究。90年代后,又在国内率先开展了造血干细胞亚群分析、分选及增殖分化调控研究,造血干/祖细胞体外扩增和定向诱导分化研究,造血干细胞作为靶细胞的基因治疗研究,以及人胎肝细胞输注、低分子抑瘤物净化白血病细胞的自体骨髓移植、动员外周血造血干细胞移植、脐带血造血干细胞移植和非清髓预处理对造血干细胞移植等系列研究,开创了我国干细胞与再生医学研究之先河,取得了一系列重要成果,奠定了我国干细胞研究的理论、技术和人才基础,为我国干细胞的研究与应用做出了突出的贡献,获得同行的高度认可。

近年来,随着国内外干细胞研究与应用的迅猛发展,我院又系统开展了胚胎干细胞自我更新与干性维持机制、干细胞增殖分化调控、干细胞发育的微环境调控、细胞重编程与诱导性多能干细胞(iPS细胞)、干细胞建系与建库技术、造血发育调控与造血干细胞移植新策略、针对多种疾病再生修复的成体干细胞治疗、肿瘤干细胞筛选与鉴定、干细胞为种子细胞的三维组织构建、干细胞相关的基因治疗、干细胞再生相关药物等多个领域的研究,并取得一系列突出进展。

1 胚胎干细胞及发育调控

不同的滋养细胞能够为人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)的扩增与定向分化提供特定的微环境。同时,为了适应未来的临床应用,避免动物源性污染,我们建立了新的人源性基质细胞用于hESCs扩增培养与诱导分化的研究。在此基础上,基于低氧微环境有利于hESCs干性维持的理论,我们构建了过表达低氧诱导因子的人源性基质细胞,该基质细胞能模拟低氧微环境,有效维持和扩增hESCs。与此同时,我们还建立了表达碱性成纤维因子的人源性基质细胞系,以该细胞系作为饲养层培养hESCs,不需外源添加碱性成纤维因子,并且能很好地维持干细胞的自我更新和多向分化能力,该培养体系为最终获得安全、低成本的hESCs的规模化扩增和诱导分化打下很好的工作基础。

在稳定培养和扩增人胚胎干细胞的基础上,我们探讨其发育分化的调控机制并优化其相关体系。在诱导人胚胎干细胞向造血细胞分化的过程中,为促进其高效向红系细胞分化,我们首先用外源性EPO基因导入的人胎肝基质细胞条件培养基来诱导人ES细胞向造血细胞分化,结果表明该条件培养基能高效诱导人ES细胞向红系细胞的分化。与此同时,我们还通过与OP9基质细胞共培养的方法,成功诱导了人胚胎干细胞分化为造血细胞,并进一步在该模型中研究PGE2在人胚胎干细胞向造血细胞分化中的作用,结果表明PGE2能够有效促进人胚胎干细胞向造血细胞的分化与扩增,而且smad信号通路在该过程中扮演了重要角色。

为更好地了解和提高胚胎干细胞向造血系统发育分化的机制和效率,我们同时关注胚胎造血发育机制。小鼠胚胎发育过程中血管内皮和造血细胞的发育生物学关系至今尚未完全阐明,我们研究发现,在小鼠胚胎AGM区中存在着高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC),它具有成血血管细胞特性,可向造血和内皮细胞分化,产生的内皮细胞具有体外成血管功能,该HPP-CFC的空间分布为AGM区特异,为今后研究小鼠胚胎AGM区成血-血管细胞发育及其调控机制建立了一种新模型。胚胎造血实质上是具有不同分化潜能的前体细胞,如成血-血管形成细胞、原始红系前体细胞和永久造血多能祖细胞等有序形成的过程。我们利用Smad5基因敲除小鼠和胚胎干细

胞体外分化模型研究发现, *Smad5* 可能介导由中胚层细胞向造血特化的负向调控, 并有助于解释成血-血管细胞数量的增加. 同时 *Smad5* 基因对于胚胎造血发育调控的必要性和多样性, 也反映了其上游配体 TGF- β 家族分子在胚胎造血发育中作用的特点.

2 成体干细胞研究

成体干细胞是存在于成年或胚胎组织中的、具有潜在的自我更新和向特定类型细胞分化潜能的干/祖细胞, 在成体体内, 其往往处于静息状态, 当组织疾病或损伤时进入细胞周期, 开始活跃地增殖并在局部微环境刺激下向某种类型细胞分化, 发挥组织修复和再生功能. 我们利用成体干细胞的这些特性, 建立了一系列体外分离、纯化、扩增和诱导分化等系列理论和技术, 这些研究一方面为深入探讨成体干细胞的生物学特性提供丰富的理论依据, 也为其在组织损伤后修复再生中的应用提供良好的种子细胞来源.

骨髓或脐带血来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有来源丰富, 取材方便等优点, 成为成体干细胞中最早并最多研究的对象. 我们利用多种细胞因子及细胞外基质组合或与基质细胞共培养等方法, 成功将骨髓 MSCs 诱导分化为皮肤、血管内皮、胰岛、神经、心肌、肝脏等功能性的组织类型细胞. 此外, 我们还在建立高效获得破骨细胞的方法的基础上, 探讨 MSCs 对单核细胞来源破骨细胞发育与功能的影响, 结果表明 TNF α 通过 JNK 和 PI3K 通路刺激 MSCs 抑制破骨细胞的发育与功能.

与此同时, 我们在诱导骨髓 MSCs 向胰岛分化方面也取得良好进展. 研究表明 PDX-1 基因参与诱导间充质干细胞向能分泌胰岛素的细胞分化, 为了改进分化细胞的功能, 更好地探讨发育分化机制, 我们进一步寻找诱导干细胞向胰岛细胞分化成熟的新方法. 研究表明, 沉默转录因子 *NRSF* 基因的表达, 可以显著提高干细胞分化产生的具有胰岛素分泌功能细胞的糖反应性.

除了骨髓和脐带血来源的 MSCs 外, 更多来源的 MSCs 的被分离与鉴定, 为进一步的为 MSCs 的基础和应用研究提供了更为丰富的来源. 其中, 与捐献骨髓或采集动员外周血相比, 作为胎儿娩出后的“废弃”物的胎盘, 供者无痛苦, 污染机会少. 2004 年, 我

们首次表明从人成熟胎盘能够获得丰富的 MSCs 细胞. 胎盘 MSCs 具有与骨髓 MSCs 相似的形态、细胞表型和诱导分化能力. 胎盘 MSCs 可协同早期作用细胞因子扩增原始造血前体, 此类作用强于骨髓来源 MSCs, 有力支持了胎盘是造血干细胞扩增的微环境(niche).

除骨髓、胎盘组织外, 从肥胖人群经吸脂术或患者手术切取的脂肪组织也可分离出大量的、具有类似增殖和分化潜能的 MSCs(脂肪组织来源的干细胞 ASCs), 它越来越成为基于干细胞的组织再生的理想种子细胞来源. ASCs 除了能向脂肪细胞分化外, 在特定条件下, 还具有向骨、软骨、血管内皮细胞等分化的潜能, 将 ASCs 与 PLGA 材料相结合, 在细胞因子作用下, 可得到类似肝组织样的结构, 该结构在体内外均表现出肝组织特异性的功能.

在对不同种类的成体干细胞进行分离鉴定与诱导分化的同时, 我们探讨 MSCs 的功能, 尤其关注其免疫调节功能及其作用机制. GVHD 是异体造血干细胞移植后长期存在的最棘手问题. 我们的研究发现, 输注骨髓来源的 MSCs 可显著延长 GVHD 小鼠存活时间, 减轻靶器官的病理损伤, MSCs 改变了脾脏 T 细胞的比例并可抑制 T 细胞从二级淋巴器官(SLO)向靶器官迁移, 从而抑制 GVHD, 该过程可通过促进 Tregs 迁入, 减少 DC 迁入 SLO, 从而减少 T 细胞活化, 保持其 T 细胞幼稚状态和 SLO 归巢特性来实现.

进一步的体外实验研究表明: MSCs 可显著抑制 CD14⁺单核细胞向 DC 的分化, 细胞间接触和可溶性分子均参与 MSCs 对 DC 发育的可逆性负调控. 此外, MSCs 还抑制已定向分化 DC 的成熟和功能. 对分子机制的初步探讨表明, MSCs 可能通过抑制 p38 MAPK 信号转导通路的活化来下调 DC 分泌 IL-12 的能力, 该研究首次证明 MSCs 对 DC 具有负调控作用, 为进一步阐明 MSCs 的免疫调控机制和寻找新的治疗靶标提供了新思路.

3 组织工程研究

组织工程的最终目的是工程化生产可以用于替代人体不可逆损伤的、功能退化的组织/器官, 使更多的患者得到及时治疗, 为根本解决人体重要生命器官的疾病带来新的途径, 从而提高人类的健康水平

和生活质量. 经过近十年的不懈努力, 我们在组织工程研究领域取得了长足的进步, 针对心脏、子宫、肺脏、肝脏等重要生命器官的再造研究不断取得突破.

在心肌组织工程方面, 我们运用生物反应器内拟胚体规模化扩增、ESCs 诱导分化、诱导后获得的心肌细胞密度梯度离心纯化等技术手段, 应用小鼠 ESCs 来源心肌细胞作为种子细胞, 以液态胶原为支架构建了组织工程化心肌条带, 首次在国际上应用 ESCs 诱导分化来源的心肌细胞成功在体外构建出工程化心肌条带, 研究结果对于加速推进 ESCs 应用于心肌组织工程进程具有重要意义.

在子宫组织工程方面, 我们利用扩增的子宫内膜细胞在体外成功构建出子宫内膜片层组织, 并证明其具有胚胎发育支持作用. 在此基础上, 我们选用组成兔子宫 3 种主要细胞进行分离和扩增, 构建了类似于自然子宫的由三层细胞组成的三维片层, 研究结果表明, 再造的组织工程化子宫具有与正常子宫壁类似的三层组织结构, 并且表现有明显的促进胚胎在体外的发育率和发育质量的作用. 运用组织工程技术研制的子宫组织片层, 作为胚胎早期发育分化研究、子宫内膜异位症等子宫疾病研究和子宫疾病治疗药物筛选研究的体外模型, 具有极为重要的科学研究价值.

在肺脏组织工程方面, 我们采用组织工程技术开展了肺泡和支气管粘膜体外再造研究. 研究表明, 组织工程化肺脏的构建可以为肺脏疾病治疗提供新的技术和手段, 此外, 再造组织还可以作为肺脏疾病研究模型或者治疗肺脏疾病药物筛选、毒性检测的模型.

除此之外, 我们还开展肝脏组织工程的研究, 并取得良好进展. 肝脏是机体中重要的代谢器官. 以肝细胞或肝干细胞为种子细胞, 以天然或人工合成、可降解、高选择通透性的多聚材料为支架材料, 激光打印或快速成型技术, 制备具有特定形状、结构和功能的组织工程化肝脏, 不仅为药物毒物代谢评价提供体外研究工具, 也为细胞或组织移植治疗多种原因引发的肝衰竭奠定技术基础. 我们将脂肪组织分离的 MSCs 与 PLGA 材料相结合, 在特定细胞因子组合条件下, 得到具有肝脏功能的组织工程肝单元, 移植入肝损伤大鼠体内后可改善肝衰竭症状和明显提高动物存活率. 我们制备微囊化的肝干细胞与肝基质细胞, 该细胞在合适的微环境中长期存活, 还能起到

免疫隔离的作用, 使得移植细胞长期发挥肝细胞的功能替代作用.

4 肿瘤干细胞研究

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是存在于肿瘤细胞中的一小群具有高度自我更新能力的肿瘤细胞, 是肿瘤耐药性和术后复发的“罪魁祸首”. 分离富集肿瘤干细胞, 揭示肿瘤干细胞发生、维持以及功能发挥过程中的关键性信号通路及调控分子, 不仅有助于人们揭示肿瘤发生的本质, 更可以为临床上针对肿瘤干细胞的靶向治疗提供重要靶标分子, 具有重要的理论与研究意义.

在前期的研究工作中, 我们首先建立了“肿瘤球”(Tumorsphere)培养模型, 对肿瘤干细胞(胃癌肿瘤干细胞, 乳腺癌肿瘤干细胞)进行了分离富集, 通过耐药性和裸鼠体内成瘤性实验表明, 这些“肿瘤球”细胞具有肿瘤干细胞特性. 进一步的研究表明: Sonic Hedgehog 信号通路在肿瘤干细胞中明显激活, 且该信号通路对于肿瘤干细胞自我更新和耐药性的维持具有重要作用.

正如正常干细胞的维持离不开微环境的作用, 另一方面, 我们也重点关注肿瘤微环境中的基质细胞及其所分泌的重要分子对于肿瘤干细胞维持的作用. 研究结果表明, 肿瘤微环境中的间质细胞(包括间充质干细胞, 肝星状细胞等)对于肿瘤干细胞的增殖具有调控作用. 其中间充质干细胞通过 EGF/EGFR/Akt 信号通路对肿瘤干细胞的生长发挥具有促进作用, 而另外一部分的研究表明肝癌微环境中肝星状细胞表达的表皮形态发生素(Epimorphin, EPM)分子通过 FAK-ERK-MMP 信号通路促进肿瘤的转移.

在对干细胞和肿瘤干细胞分化调控机制研究的同时, 我们也对参与胚胎早期发育和肿瘤形成的关键基因进行了筛选和研究, 肿瘤发生的很多调控机制都涉及到经典的胚胎发育信号通路, 因此这二者具有密切相关性. 我们的工作包括对参与正常/异常发育的人新基因进行筛选、克隆、及其相关功能的系列研究. 在国际上首次克隆并命名了人新基因 *spindlin1* (AF317228, 国家发明专利 ZL02120838.7). 该基因为胚胎早期发育相关蛋白, 参与卵母细胞的成熟以及受精卵细胞的分裂, 在此后的发育过程中

逐渐消失,但在包括卵巢癌在内的恶性肿瘤中,spindlin1 又重新表达并与肿瘤细胞的恶性行为相关,进一步研究表明,spindlin1 是参与细胞周期的重要肿瘤相关核蛋白,spindlin1 蛋白表达的增加可以引起肿瘤细胞周期阻滞,且可能通过引起细胞染色体不稳定以及与 Aurora-A 激酶发生相互作用而促进肿瘤的发生.

5 干细胞临床治疗研究

我院造血干细胞移植中心于 1959 年在国内最早进行实验动物骨髓移植研究,1981 年在国内率先开始临床异基因骨髓移植,1987 年,开展规模化临床骨髓移植治疗,1995 年首先在大陆开展异基因外周血干细胞移植,1997 年,在国内率先开展了 CD34⁺细胞移植,至今共已完成 2200 余例各类造血干细胞移植.我们最早开展骨髓间充质干细胞支持造血重建和诱导免疫耐受的临床研究,发现间充质干细胞与异基因造血干细胞共输注,可以降低 GVHD 的发生率.

为了提高造血干细胞移植的效率,我们在体外对造血干/祖细胞(CD34⁺细胞)进行有目的扩增,并将其有效地应用于造血干细胞移植.我们应用骨髓基质细胞系、永生化的脐静脉内皮细胞系和胎肝基质细胞系、骨髓和胎盘来源的 MSCs 作为造血细胞的饲养层,发现其能不同程度的扩增 CD34⁺细胞、CFC 和 LTC-IC 数量,能够为造血干细胞移植提供充足的细胞来源.

目前临床血液来源十分紧张,而且临床用血的安全性也受到极大的挑战,因此寻找更为安全和经济的血液来源一直是输血医学研究的重要方向,干细胞技术的发展使得体外获得和正常血细胞完全一样的血细胞替代产品成为可能.针对干细胞来源的血细胞产品的临床应用,我们成功研发了两项来源于脐带血的造血祖细胞产品:巨核系祖细胞注射液和红系祖细胞注射液,制定了产品的标准操作规程,完成了产品临床前研究,获得了国家食品药品监督管理局

理局颁发临床试验批文,并已经完成了巨核系祖细胞注射液的 I/II 期临床试验,结果表明该产品具有安全性和一定的有效性,目前进一步的临床试验正在进行之中.

此外,我们开展自体骨髓间充质干细胞移植治疗急性心肌梗死的临床试验,证明了其治疗的安全性,具有较好的应用前景.与此同时,我们输注体外诱导扩增的自体树突状细胞,用于预防自体造血干细胞移植后的急性髓性白血病(AML)复发,将自体造血干细胞移植后急性髓性白血病的长期生存率从 50%提高到 76%.急性髓性白血病细胞在细胞因子诱导下体外分化成的 AML-DC 细胞与正常人的 DC 细胞相比,存在着表型和功能缺陷.因此我们设计并筛选出特异的 siRNA,以其下调 AML-DC 细胞的锌指蛋白 A20 的表达,能有效刺激 T 细胞的活化,有望提高急性髓性白血病的细胞免疫治疗效果.

6 结语

针对我国干细胞与再生医学发展的重大社会需求,以及我院多年来在干细胞领域的丰厚积累和人才、技术、平台等的传统优势,我们将进一步瞄准干细胞与再生医学的重大科学问题和关键技术,以替代、修复或再生人体各种组织器官的“再生医学”为主线,以干细胞分离鉴定、增殖分化调控、临床级干细胞建系与建库、细胞重编程、干细胞规模化扩增与定向诱导分化、重要疾病干细胞再生修复治疗、肿瘤干细胞筛选与鉴定、复杂组织器官的三维构建、干细胞技术为基础的药物治疗、干细胞平台与基因组和蛋白质组等为研究重点,建立、完善和细化相应的技术标准、准入规范和相关伦理学准则,建立具有一定规模的高水平研究和应用基地,形成我院干细胞与再生医学研究开发的关键技术体系,研发系列具有自主知识产权的关键技术和产品,并培养一批优秀的科研团队和人才梯队,使我院干细胞技术研究和应用的整体水平进入世界先进行列.

撰稿人: 裴雪涛