

- cing CD4 + T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 2001, 69 (4):2666 - 2674
- 14 Jung YJ, Ryan L, LaCourse R, et al. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice [J]. J Exp Med, 2005, 201 (12):1915 - 1924
- 15 Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL - 23 and IL - 17 in the establishment of protective pulmonary CD4 + T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge [J]. Nat Immunol, 2007, 8 (4):369 - 377
- 16 Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine - mediated protection against *Leishmania major* [J]. Nat Med, 2007, 13 (7):843 - 850
- 17 Klucar P, Barnes PF, Kong Y, et al. Characterization of effector functions of human peptide - specific CD4 + T - cell clones for an intracellular pathogen [J]. Hum Immunol, 2008, 69 (8):475 - 483
- 18 Winkler S, Necek M, Winkler H, et al. Increased specific T cell cytokine responses in patients with active pulmonary tuberculosis from Central Africa [J]. Microbes Infect, 2005, 7 (9 - 10):1161 - 1169
- 19 Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, et al. Distinct, specific IL - 17 - and IL - 22 - producing CD4 + T cell subsets contribute to the human anti - mycobacterial immune response [J]. J Immunol, 2008, 180 (3):1962 - 1970
- 20 Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, et al. Bacillus Calmette - Guerin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles [J]. J Immunol, 2008, 180 (5):3569 - 3577

(收稿:2011 - 10 - 25)

(修回:2011 - 11 - 08)

成体干细胞体外培养的安全性研究进展

张 文 李爱斌

一直以来,干细胞都是医学领域的研究热点,随着对干细胞特性的逐步认识,干细胞技术得到了突飞猛进的发展,在再生医学与组织工程等方面具有不可替代的应用前景。但是,随着研究的深入,人们发现多数肿瘤的发生与干细胞有着一定的关系,肿瘤细胞与干细胞之间存在着一定的相似性。有多数学者提出了肿瘤源于干细胞的假说,近几年也有肿瘤干细胞这一说法。现在,已有研究表明干细胞在体外培养一定时间,即可发生突变。所以,干细胞的安全性已引起人们的高度重视。

一、干细胞

干细胞(stem cells, SC)是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的原始细胞,处于未定向分化状态,同时具有增殖的能力。在一定条件下,可以分化成具有特异分子标志、特征性形态和特殊功能的成熟细胞。干细胞具有自我更新的能力是由于通过不对称分裂的子代细胞维持了干细胞的潜能。根据干细胞发生学来源可以将其分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和成体干细胞(somatic stem cell)两种。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870638);湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA223)

作者单位:430060 武汉大学人民医院生殖医学中心

通讯作者:李爱斌,教授,硕士生导师,电子信箱:wwfirst@163.

com

胚胎干细胞属于全能干细胞,发育等级较高,来源于胎盘和胎儿组织,是由受精卵发育而来的具有全能性的干细胞,分化潜能较广^[1]。成体干细胞,来源于成体器官或者成年个体组织,是存在已分化组织中的未分化细胞^[1]。虽然成体干细胞的增殖能力有限,但是依然具有较强的自我更新和分化潜能,可以分化为某种或某几种功能的体细胞,同时具有可塑性,可以打破胚层界限从而横向分化为无关类型的成熟细胞或者在特定的环境下发生逆分化^[2]。

二、肿瘤干细胞

随着对肿瘤发生、发展研究的深入,有多数学者提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤生长,复发和转移是依靠肿瘤细胞中一定数量的具有干细胞特性的细胞群。1994年,人急性粒细胞白血病干细胞首次得到证实,之后又在乳腺癌瘤体中分离出肿瘤干细胞。2006年,肿瘤干细胞的定义于美国癌症研究协会召开的肿瘤干细胞研讨会上提出,即在肿瘤组织中具有自我更新能力,同时可以产生一系列异质性肿瘤细胞^[3]。之后,肿瘤干细胞受到多领域的关切,陆续有研究证实,在不同的肿瘤组织中均存在肿瘤干细胞,比如脑部、皮肤、白血病、乳房、结肠、头颈部、肾脏、肝脏、前列腺、和胰腺肿瘤,并且证实了肿瘤干细胞在耐药,肿瘤复发和肿瘤转移中起了主要作用^[4-11]。

肿瘤干细胞具有很强的致癌能力,也就是说肿瘤

干细胞可以不断自我更新,并形成不同分化程度的肿瘤细胞,但是肿瘤细胞会丧失不断增殖的能力,最终死亡,所以说肿瘤干细胞在启动肿瘤形成、生长中起决定性作用^[12]。

三、肿瘤干细胞与正常干细胞的关系

目前,关于肿瘤干细胞的起源有不同的观点,一种认为肿瘤干细胞源自正常干细胞,另一种认为肿瘤干细胞是正常体细胞突变而来。现在,越来越多的研究结果支持第一种观点:即肿瘤干细胞很可能是由正常干细胞在长期的自我更新过程中,发生了基因突变,使部分调控干细胞增殖分化的信号转导通路中的信号蛋白发生了变化,被不正常的信号诱导为肿瘤干细胞。肿瘤的发生是一个多基因、多步骤的基因变化效应,是经历了多阶段后产生的,正常体细胞突变成肿瘤需要复杂而漫长的过程,而成熟细胞半衰期短,所以,体细胞突变成肿瘤的可能性小。而正常干细胞是唯一能够自我更新的细胞,寿命长,更有可能积累足够的突变基因,转化为肿瘤干细胞。

肿瘤有可能源自干细胞增殖过程的任何阶段受到阻断,所以肿瘤分化程度与其相应起源的干细胞分化阶段相关。如果阻断发生在干细胞分化阶段的早期,则肿瘤细胞就表现为低分化;如果阻断发生在后期,肿瘤细胞表现为高分化。与之相应的是临床上的良性肿瘤和恶性肿瘤之分。

随着研究的深入,发现肿瘤干细胞与正常干细胞具有一些相似点,两者都具有自我增殖和更新的能力,不过干细胞的增殖具有自稳定性,在增殖过程中,总数目保持恒定,而肿瘤干细胞仅仅表现出无限增殖的能力,并无自稳定性。干细胞具有迁移性,可迁移到特定的组织或者器官,与肿瘤干细胞的转移能力相似。再者,肿瘤干细胞与干细胞的生长调控机制具有相似性,一些研究表明干细胞生长发育的信号转导通路与肿瘤相关的经典信号通路相似,例如 Bmi-1、Notch、Wnt、SHH 等^[13-15]。

干细胞在体内主要起到修复损伤组织的作用,组织受损即激活体内 Hedgehog 和 Wnt 信号途径,使干细胞增殖分化,修复损伤的组织。如果机体处于长期受损状态,Hedgehog 和 Wnt 信号途径就会一直被激活,这些信号传导通路在细胞癌变方面也起到一定的作用,这时在环境或者致癌因子等不利因素的影响下,会导致信号传导途径中某些分子发生突变,引起干细胞过度增殖,形成肿瘤。有研究证实,如果间充质干细胞或者骨祖细胞向成骨细胞的分化途径被阻

断,就会转变为骨肉瘤^[16]。

四、体外培养对干细胞的影响

干细胞在临床的治疗和应用前景已经明确,但是,由于人体内干细胞的数量有限,所以必需在体外大规模扩增干细胞。我们知道,任何生物体都有适应其生存的微环境,称之为壁龛(niche),干细胞的壁龛包括基膜成分、细胞外基质蛋白、间质细胞以及成体干细胞衍生的细胞因子等成分组成,壁龛的成分与结构特殊性是维持不同谱系干细胞处于相对未分化状态的关键。所以,当干细胞在体外培养时,由于处于相对开放的环境中,并且接触到一些血清、细胞因子、酶等一些化学和生物制剂,失去了原本适合其生存的壁龛,再加上干细胞与肿瘤干细胞的一些生物学特性极为相似,所以一些研究者就对长期体外培养的干细胞的生物学性状以及安全性进行研究。

有研究者对猪骨的骨髓间充质干细胞进行体外培养,发现传至 40 代以后,干细胞即出现老化的特征,比如说肌动蛋白过量积蓄,溶酶体酸牛乳糖苷酶活性增加,基质黏附性降低等。据文献报道,在体外培养的晚期干细胞分化潜能以及分化能力下降,生物学特性已经发生改变。据 2002 年 Science 报道,将人类胚胎干细胞种植帕金森病的小鼠大脑内,一些小鼠体内的干细胞分化为多巴胺能神经元,但是另一些小鼠体内的干细胞分化为畸胎瘤导致小鼠死亡。在长期的体外培养过程中,由于染色体的不稳定和错乱基因的堆积,正常的细胞周期失控,可能发生错乱的信号调控,导致干细胞发生突变。有研究报道,将胚胎源性神经干细胞种植遗传性退行性病变的患者中,在患者的脊髓和脑组织中发现了肿块。Wu 等通过向裸鼠皮下注射在体外传至 17 代的神源性干细胞,发现有个别裸鼠皮下有肿块生长,取肿块组织并进行原代培养,发现得到的细胞不仅保持干细胞的特性、表达干细胞标记蛋白以及 CD133,同时还发现有异常染色体核型,并且具有快速增殖的特征,将这些细胞在体外长期培养并注入裸鼠皮下后发现,虽然这些细胞不具有皮下致癌性,但是却导致颅内肿瘤的发生。如何确保既能获得充足数量的干细胞又能避免干细胞突变需要更进一步的研究。

五、干细胞安全性的主要检测方法

干细胞移植人体后,在体内的转化过程更加不易控制,所以,需要对体外培养的干细胞进行严格的生物特性及安全性检测,确保人体移植的安全性。目前,干细胞安全性的主要检测指标大概包括以下几

种:①形态学观察:应用倒置显微镜和透射电镜对于细胞的形态和超微结构进行观察;②细胞生长周期的检测;③干细胞核型分析,采用 G 显带方法观察染色体是否有缺失,易位和倒位、融合等异常变化;④裸鼠皮下致瘤性,观察裸鼠皮下干细胞注射部位是否有肿块形成;⑤检测肿瘤相关基因的表达情况;⑥细胞凝聚实验,使用植物凝集素 ConA 检测细胞表面结构是否发生恶性转化;⑦双层软琼脂培养,使用双层软琼脂培养基判断细胞是否具有 AIG 特点(AIG:即锚着独立性生长,正常细胞在体外培养过程中必须附着于坚韧的表面,而恶性细胞失去贴壁依赖性,可在半固体基质中克隆)等检测方法。

总之,干细胞的移植给医学界带来了希望,同时体外培养技术为干细胞的移植提供了可能性,但是由于干细胞在体外长期培养过程中会受到外界因素的影响,所以在临床应用前还有很多的问题需要解决。找到成体干细胞体外培养最合理的扩增倍数,既能获取大量纯化的干细胞,又能保证在治疗过程中的安全性和有效性,还需要进一步的努力。

参考文献

- Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, *et al.* Potential of embryonic and adult stem cells *in vitro* [J]. *Biol Chem*, 2003, 384(10-11):1391-1409
- Tsai R Y, Kittappa R, Mc Kay RD. Plasticity, niches, and the use of stem cells [J]. *Dev Cell*, 2002, 2:707
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, *et al.* Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-9344
- Sasaki A, Boyce BF, *et al.* Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(16):3551-3557
- Lapidot T, Sirard C. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645-648
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, *et al.* Identification of a tumor - initiating stem cell population in human renal carcinomas [J]. *FASEB J*, 2008, 22(10):3695-3705
- Bae KM, Su Z. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells [J]. *J Urol.*, 2010, 183(5): 2045-2053
- Li X, Lewis MT, Huang J, *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer to chemotherapy [J]. *J Nat Cancer Inst*, 2008, 100(9): 672-679
- Singh SK, Hawkins, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumor initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401
- Murase M, Kano M, Tsukahara T, *et al.* Side population cells have the characteristics of cancer stem - like cells/cancer - initiating cells in bone sarcomas. *Brit [J]. J Cancer*, 2009, 101(8):1425-1432
- Ginestier C, Hur MH. ALDH1 is a maker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. *Cell Stem cell*, 2007, 1(5):555-567
- Altanerova V, Altancer C. Cancer stem cells [J]. *Neoplasma*, 2005, 52(6): 435-440
- Liu S, Dontu G. Hedgehog signaling and Bmi - 1 regulate self - renewal of normal and malignant human mammary stem cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12):6063-6071
- Fan X, Matsui W. Notch pathway inhibition depletes stem - like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15):7445-7452
- Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors [J]. *Curr Op in Cell Biol*, 2004, 16(6):708-712
- Mohseny AB, Szuhai K. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2 [J]. *J Pathol*, 2009, 219(3):294-305
- (收稿:2011-11-22)
- (修回:2011-11-24)
- (上接第 184 页)
- Ruden S, Hilpert K, Berditsch M, *et al.* Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane - permeabilizing antimicrobial peptides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53:3538-3540
- Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers [J]. *J Endod*, 2008, 34(1): 90-93
- Adam D, Jeremy S. Water sorption and solubility of methacrylate resin - based root canal sealers [J]. *Basic Research - Technology*, 2007: 990-994
- Vasiliadis L, Kodonas K, Economides N, *et al.* Short - and long - term sealing ability of Gutta - flow and AH - Plus using an ex vivo fluid transport model [J]. *Int Endod J*, 2010, 43(5):377-381
- Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria - Junior N, *et al.* Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA - based sealers [J]. *Int Endod J*, 2011, 44(4):370-375
- Nawal RR, Parande M, Sehgal R, *et al.* A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for epiphany, guttaflow and AH - Plus sealer [J]. *Int Endod J*, 2011, 44(4):307-313
- Barcelos R, Santos MP, Primo LG, *et al.* ZOE paste pulpectomies outcome in primary teeth: a systematic review [J]. *J Clin Pediatr Dent*, 2011, 35(3):241-248
- Silva - Herzog D, Ramirez T, Mora J, *et al.* Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers [J]. *Int Endod J*, 2011, 44(5):440-446
- Ashraf H, Taherian A, Kerdar AN. Evaluation of cytotoxicity of two root canal filling materials by MTT assay [J]. *Aust Endod J*, 2010, 36(1):24-28
- (收稿:2011-09-27)
- (修回:2011-10-24)