文章编号:1000-5404(2009)14-1327-02

专家述评

间充质干细胞表述中需要注意的几个问题

史春梦 (第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)通常是指胚胎发育过程中在多种成体间叶(mesenchyme)组织(如骨髓基质、脂肪、皮肤真皮等)中存留下来的未分化的原始细胞,其具有长期自我更新和发生多向分化的潜能[1-3]。对于间充质干细胞,早期的研究多遵循干细胞鉴定的严格标准,但从20世纪90年代末开始,随着研究领域的不断扩展,在与间充质干细胞相关的一些研究中对干细胞的鉴定常常不够严谨和充分,由此产生了一些模糊甚至不一致的认识[4-8]。而且,由于概念表述上的不明确、不一致以及在实验方法上的差异也导致对不同实验室来源的研究结果难以比较。针对这一问题,国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)在2005、2006年连续发表声明[9,10],建议规范"间充质干细胞"和"MSC"的使用,并为实验室和临床前期研究提出了定义人来源MSC的参考标准。现参照文献,并结合我们的工作,就间充质干细胞表述中需要注意的几个问题进行探讨。

1 间充质干细胞的含义与用法

干细胞是一个严格的概念,需要对细胞长期的自我更新能力(不仅仅是细胞的增殖能力)和发育潜能(包括分化能力)进行鉴定。因此,对干细胞生物学的基础研究通常需要进行基于单个细胞克隆的研究,并需要对细胞的自我更新能力和发育潜能进行严格鉴定,对间充质干细胞也不例外。但目前大多数研究均采用组织原代培养的贴壁细胞,由于方法上的局限,所获得的通常是含有多种类型细胞的混合群体,而且对细胞自我更新能力和发育潜能的研究往往不够充分。因此,在2000年ISCT召开的间质细胞治疗相关的学术会议上,大多数研究人员认为,目前对于没有进一步纯化和鉴定的贴壁生长的细胞群缺乏"干细胞"所必须的证据[11]。因此,在对所培养细胞的描述过程中如用"干细胞"这一术语,应特别谨慎,需要有对细胞长期自我更新能力和发育潜能的鉴定。而由于受到技术水平的限制,这些鉴定工作目前在一般实验室通常很难进行。基于这一点,如果没有进行单个细胞克隆基础上的严格鉴定,不适宜应用"间充质干细胞"的概念。

2 多潜能间(基)质细胞的含义与用法

尽管使用"间充质干细胞"的表述需要严格遵循干细胞的鉴定标准,但是,一方面由于干细胞在组织中的含量极其稀少,目前对单个干细胞的分离和应用技术还难以广泛开展;另一方面,即使是单个干细胞来源,在扩增过程中,也会产生处于不同发育阶段、具有不同分化潜能的细胞亚群,而且从临床应用角度,并参照骨髓移植的成功经验,对于一些与应用相关的研究,不一定需要严格界定所应用细胞必须是单个干细胞来源。因此,ISCT建议将经过一定技术手段纯化和富集的含有间充质干细胞的混合贴壁细胞,命名为"多潜能间质细胞"(multipotent mesenchymal stromal cells, MSC)[9]。进行这一修改,既便于读者将与间充质干细胞有关的工作联系起来,同时也明确了所研究细胞的特性。为了尽量便于平行比较,ISCT根据目前的研究进展,对"多潜能间质细胞"也进行了相对严格的界定,并给出了人骨髓来源多潜能间(基)质细胞鉴定的最低标准[10]:① 多潜能间(基)质细胞一定是标准培养条件下的贴壁细胞;②流式细胞检测结果≥95%的多潜能间(基)质细胞必须表达CD105、CD73、CD90,≤2%的多潜能间(基)质细胞低表达CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79α、CD19、HLA-DR;③多潜能间(基)质细胞能够在体外标准诱导条件下,分化为3种或3种以上不同类型的细胞,如成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞。上述标准缺一不可,否则不应使用多潜能间(基)质细胞的术语。此外,由于多潜能间(基)质细胞可以有不同的来源,ISCT建议,不同种属和不同组织来源多潜能间(基)质细胞的鉴定也应参照上述标准进行。对于从骨髓中直接分离的贴壁生长的细胞,如果没有按照上述标准进行鉴定,我们建议描述为"骨髓基质来源的贴壁细胞",或沿用以往的方法,称其为"骨髓基质细胞"。

3 间充质干细胞、CFU-F和成纤维细胞的关系

成纤维细胞(Fibroblast)是间充质干细胞来源的、广泛存在于机体各个器官的间质组织细胞,具有合成和重建细胞外基质等功能。由于成纤维细胞和间充质干细胞具有类似的细胞形

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522605);教育部高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200777);国家自然科学基金(30870966)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605); the Foundartion for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200777); National Natural Science Foundation (30870966)

作者简介:史春梦,男,天津市人,博士,副教授,博士生导师,主要从事难愈创伤修复与成体干细胞的应用基础研究。承担国家、军队和地方各类课题10余项,发表论文60余篇,获得军队科技进步一等奖、重庆市自然科学二等奖、全国优秀博士学位论文等奖励。电话:(023)68752280,E-mail:shicm1010@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-03-30;修回日期:2009-04-08

态和贴壁生长的特性,在对成纤维细胞进行常规分离培养的过程中,可能混杂有间充质干细胞。在这种条件下,如果间充质干细胞获得一定的扩增,对成纤维细胞的研究就有可能得到与间充质干细胞相似的性状[12],如具有相似的表面标志分子,表达 CD105、CD73,不表达 CD45、CD34、CD14;甚至给予诱导分化后,也可以表现出一定的异向分化能力,如成脂、成骨、成软骨分化等;甚至一些成纤维细胞群还可表现出类似间充质干细胞所具有的免疫抑制作用。但是需要明确的是,间充质干细胞和成纤维细胞处于不同的发育阶段,后者的发育阶段更为成熟,表达分化相关的分子标志,并执行一些特定的功能。近年来有研究报道,骨髓来源的间充质干细胞和机体各个部位来源的成纤维细胞具有不同的基因表达谱[13]。我们的研究也表明,皮肤真皮的间充质干细胞和成纤维细胞具有不同的生物学特性和基因表达谱。如皮肤真皮的间充质干细胞可以诱导毛囊样结构的形成,而成纤维细胞则不具有类似的功能[14]。因此,在采用贴壁的方法分离间充质干细胞的过程中,应特别考虑组织中成纤维细胞可能造成的干扰。此外,在一些文献中,成纤维细胞集落生成单位(colony forming unit of fibroblasts, CFU-F)被认为是间充质干细胞的一个鉴定指标。CFU-F 通常是指具有较强增殖活性的成纤维细胞样细胞在体外培养条件下呈现为类似克隆样生长的、离散且大小不等的集落[15]。间充质干细胞在体外低密度培养条件下,也可形成 CFU-F,这在一定程度上可反映间充质干细胞的增殖活性,但由于 CFU-F 不一定是单个细胞来源,其不能作为间充质干细胞唯一和特有的鉴定标准。

4 讨论

综上所述,对细胞生物学特性的鉴别和科学表述是评估研究工作的意义和进行平行比较的重要前提,特别是对于 MSC 这一英文缩写的使用及其表述更具有其特定的含义。美国国立卫生研究院(NIH)2007 年针对 Roland Nordone 等科学家发表的有关"细胞系的错误鉴定可能导致非常可怕结果"的公开信[16],专门发表指导性声明(guide notice)强调[17]:从事细胞培养,特别是干细胞研究的科研人员尤其应重视对所研究细胞的鉴定,以避免影响到研究结果的正确与否。如果不能有力地证实所获得的结果确实是针对干细胞研究的结果,那么这些结果也就没有多大意义。为此,在间充质干细胞的研究中,应根据所使用的细胞类型的具体情况,对细胞的分离方法、生长特性、表面标志、分化潜能、细胞群体的异质性等方面进行多方面的鉴定,并给予相应客观科学的表述,以避免由于概念用法的差异而造成对研究结果判定的不严谨,同时也便于不同实验室的结果进行平行比较,推动间充质干细胞研究和应用的不断进展。

关键词:间充质干细胞;多潜能间(基)质细胞
中图法分类号:R329.2 **文献标识码**:A

参考文献:

[1] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Latsinik N V, *et al*. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*[J]. Transplantation, 1974, 17(4): 331 - 340.

[2] Owen M. Marrow stromal stem cells[J]. J Cell Sci Suppl, 1988, 10: 63 - 76.

[3] Caplan A I. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641 - 650.

[4] Pereira R F, Halford K W, O'Hara M D, *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(11): 4857 - 4861.

[5] Pereira R F, O'Hara M D, Laptev A V, *et al*. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(3): 1142 - 1147.

[6] Keating A, Berkahn L, Filshie R. A phase I study of the transplantation of genetically marked autologous bone marrow stromal cells[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(4): 591 - 600.

[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]. Nat Med, 1999, 5(3): 309 - 313.

[8] Horwitz E M, Gordon P L, Koo W K, *et al*. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(13): 8932 - 8937.

[9] Horwitz E M, Le-Blanc K, Dominici M, *et al*. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2005, 7(5): 393 - 395.

[10] 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.

[11] Horwitz E M, Keating A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? [J]. Cytotherapy, 2000, 2(5): 387 - 388.

[12] Haniffa M A, Collin M P, Buckley C D, *et al*. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? [J]. Haematologica, 2009, 94(2): 258 - 263.

[13] Ishii M, Koike C, Igarashi A, *et al*. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(1): 297 - 303.

[14] Shi C, Zhu Y, Su Y, *et al*. Stem cells and their applications in skin-cell therapy[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(1): 48 - 52.

[15] He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood[J]. Stem Cells, 2007, 25(1): 69 - 77.

[16] Nardone R M. Open letter to U.S. Department of Health and Human Secretary Leavitt [EB/OL]. 2007[2009-04-23]. Http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank/qualitycontrol/OL7-11-07.pdf.

[17] National Institutes of Health (NIH). Notice Regarding Authentication of Cultured Cell Lines [EB/OL]. 2007[2009-04-23]. Http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-08-017.html.

(编辑 吴培红)