

brane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(3): 810-828.

- [14] Shi LG, Zhang GP, Jin HM. Inhibition of microvascular endothelial cell apoptosis by angiopoietin-1 and the involvement of cytochrome C. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(9): 725-730.
- [15] Valable S, Bellail A, Lesné S, et al. Angiopoietin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J*, 2003, 17(3): 443-445.
- [16] Liu XB, Jiang J, Gui C, et al. Angiopoietin-1 protects mes-

enchymal stem cells against serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(7): 815-822.

- [17] Cui X, Chen J, Zacharek A, et al. Nitric oxide donor up-regulation of SDF1/CXCR4 and Ang1/Tie2 promotes neuroblast cell migration after stroke. *J Neurosci Res*, 2009, 87(1): 86-95.
- [18] 刘开祥, 蒋静子, 唐北沙. 内皮抑素、血管内皮生长因子与脑梗死. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2006, 33(01): 65-68.

自体骨髓极小胚胎样干细胞的研究进展

郭慧娟 综述 王健, 郑敏 审校

重庆医科大学附属第二医院神经内科, 重庆市 400010

摘要:非造血组织损伤后,如何提高干细胞在组织再生过程中的修复能力是目前再生医学的研究热点。成体骨髓中含有表达 CXCR4⁺ Lin-CD45⁻的极小胚胎样干细胞(VSEL-SCs),在体外能够被定向诱导分化为心肌细胞、神经元等多种谱系细胞。自体骨髓动员的干细胞因具有多向分化潜能、无伦理学争议、无免疫源性及良好的组织融合性等优势而备受关注。

关键词:骨髓干细胞;极小胚胎样干细胞;胚胎干细胞

众所周知,骨髓是造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)产生和归巢的主要器官,骨髓中的干细胞能够使非造血器官再生也已经得到很多研究证实^[1,4],而且越来越多的研究表明高纯度的HSCs在心肌和脑等这些非造血组织损伤后的再生上并无明显作用^[5,6]。因此不同于经典HSCs的非造血干细胞群体被分离了出来,因其体积极小被称之为极小胚胎样干细胞(very small embryonic-like stem cells, VSEL-SCs)^[7]。其具有胚胎干细胞的生物学特性,在体内体外均具有多向分化潜能,且在机体组织损伤或应急情况下能够从骨髓中动员出来,在组织特异性或定向干细胞转归上具有重要调节作用,这无疑对干细胞治疗领域带来了新的福音。

1 VSEL-SCs的生物学起源及特性

1.1 VSEL-SCs生物学起源

国内外关于VSEL-SCs的研究现在仍处于起始

阶段,对其真正的生物学起源目前尚无定论,因其在体外能够分化为所有三胚层谱系,有学者提出其是由上胚层干细胞(epiblast-derived stem cells, EP-SC)派生出来的干细胞,少量来源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)的假说^[8,9],认为VSEL-SCs存在于骨髓组织发育的早期阶段,是EPSC和某些PGC的传代,因HSCs的“可塑性”理论越来越受到质疑,并认为VSEL-SCs是HSCs的前体细胞,而并非是HSCs同等级干细胞^[10]。目前关于成体VSEL-SCs的生物学起源只是假说,因此对于VSEL-SCs的真正生物学起源需要进一步的研究。

1.2 VSEL-SCs的生物学特性

目前通过透射电子显微镜、逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)、免疫荧光显色、流式分析等多种实验方法,已经能够从单细胞水平上来描述VSEL-SCs的形态学及其表面标志^[11,12]。不同种属的

收稿日期:2011-04-15;修回日期:2011-08-08

作者简介:郭慧娟(1983-),女,硕士,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:王健(1972-),男,副教授,硕士生导师,主要研究方向为脑血管病。E-mail:ian.wx@163.com。

VSEL-SCs 在形态学和表达标志物上略有不同。

1.2.1 VSEL-SCs 的形态学特点 在以往的分选技术中直径小于 $6\ \mu\text{m}$ 的细胞都当作是细胞碎片排除了,正是因为 VSEL-SCs 细胞的体积极小,多年来一直未被分选出来,被称作是“遗漏的珍珠”。小鼠来源的 VSEL-SCs 平均直径为 $(3.63 \pm 0.14)\ \mu\text{m}$ ($2 \sim 4\ \mu\text{m}$) 小于 HSCs 的平均直径 $(6.54 \pm 0.17)\ \mu\text{m}$ ($6 \sim 8\ \mu\text{m}$),而人脐血来源的 VSELs 直径在 $3 \sim 5\ \mu\text{m}$;与造血干细胞和粒细胞相比具有较高的核质比,细胞核占据细胞大部分,有核膜、核孔,含多潜能干细胞标志的开放式染色体(常染色质),二倍体核型;细胞质较少,含有较多的游离核糖体、分散线粒体,还可见轮廓状内质网和若干小泡^[13, 14]。

1.2.2 VSEL-SCs 的表面标志物 在 mRNA 水平, VSEL-SCs 是高度富含了多个早期组织/器官特异性的基因发育调控因子/标记的细胞,因此,最初曾将其描述为组织定向干细胞(TCSC)^[15]。VSEL-SCs 不但表达多潜能胚胎干细胞标志:SSEA-1(鼠类)、SSEA-3/4(人类)、Oct-4、Nanog、Rex-1、高活性端粒酶 Rif-1,还表达 CD133^+ (人和小鼠)、 Sca-1^+ (小鼠)、 CXCR4^+ 、 CD45^- 、 lin^- 、 MHC-I^- 、 HLA-DR^- 、 CD90^- 、 CD105^- 、 CD29^- 等标志^[16, 17]。

2 VSEL-SCs 的体内定向分化研究

目前研究表明已经从成体骨髓、脐血和鼠类脑、心肌、肾脏、胰腺、胎肝、外周血等损伤后的组织器官中分离出 VSEL-SCs^[18, 19]。VSEL-SCs 在体外能够被诱导分化为内、中、外三胚层细胞^[20],在体内能够定向分化修复受损组织。

2.1 体内分化机制

2.1.1 骨髓干细胞的动员步骤 首先,骨髓干细胞动员到外周血。尽管动员的机制仍不明确,但干细胞在骨髓和外周血间的迁移是一个多因素共同作用的过程,主要涉及干细胞与微环境中基质细胞、多种黏附分子、细胞因子、趋化因子等的相互作用,使干细胞与骨髓基质间的联系作用减弱,增加骨髓内皮细胞间的通透性,使骨髓干细胞动员。近年来发现趋化因子 SDF-1(基质细胞衍生因子-1)及其受体 CXCR4 在骨髓干细胞的动员过程中发挥主要作用^[21]。

其次,外周血干细胞向损伤局部的募集。外周血干细胞向骨髓归巢需要跨内皮迁移,其向损伤组织的局部定位过程可能也先要与局部内皮细胞结

合,然后再跨过内皮质沿间质间隙到达损伤局部,进行分化和修复。

再次,骨髓干细胞在局部损伤组织的定向分化。尽管干细胞在局部定向分化的分子机制尚不明,但组织损伤是促使干细胞向宿主组织中主要细胞类型分化的强大刺激^[22]。

2.1.2 VSEL-SCs 的动员 专家推测,骨髓中多种干细胞群的存在,是在个体发育过程中所有干细胞发育迁移的结果^[23]。一方面,VSEL-SC 发生在妊娠期的第二个阶段的结束和第三个阶段的开始,在发育过程中趋化迁移到骨髓中,在那里能够找到适宜的微环境,并处于休眠期。另一方面,重要的趋化因子 SDF-1 和 HGF/SF 能够与积聚在骨髓中的干细胞相应答,这些趋化因子的应答受体, α -趋化因子受体 CXCR4 和酪氨酸激酶受体 c-met,均在这些迁移的干细胞包括 VSEL-SCs 上表达。事实上,已有多个研究已经证实,在组织损伤后,外周血中存在着循环的 VSEL-SCs 干细胞,并发挥组织修复作用。

2.2 VSEL-SCs 的应用研究

2.2.1 动物研究 目前对 VSEL-SCs 的体内定向分化研究在心梗模型的研究较多,而脑梗死模型的研究相对较少。

动物实验发现,外周血干细胞向组织的归巢具有选择性。经循环灌注的骨髓干细胞选择性向心肌损伤处聚集,不但在正常心肌组织几乎未发现干细胞停留,而且在循环路径中除脾脏和骨髓中发现有少量干细胞停留外,其他脏器也未发现,绝大多数外周干细胞聚集在损伤心肌处选择性募集^[24]。机制虽未阐明,但推测组织损伤局部产生的大量细胞因子可能起趋化剂的作用,吸引循环血中干细胞向损伤局部定向归巢,虽然具体发挥作用的细胞因子种类尚不明确,但研究发现介导干细胞向骨髓归巢的重要趋化因子 SDF-1,在急性梗死心肌局部可在短时间内都处于较高水平。

Dawn 等^[25]对小鼠心梗后 48 h 再灌注模型分别心内注射外源性 $\text{Sca-1}^+ \text{Lin-CD45}^+$ 和 $\text{Sca-1}^+ \text{Lin-CD45}^-$ 后研究发现前者处理组心肌功能未见明显改善,而后者处理组的心功能明显改善且未见明显心肌肥大,结果表明小鼠急性心梗后具有一定的定向分化潜能,发挥组织修复作用的是 VSEL-SCs,而非 HSCs。Kucia 等^[26]和 Zuba-Surma 等^[27, 28]最近的研究认为,在机体生理状态下,外周血中循环的

VSEL-SCs 的水平极低,但是在急性心肌梗死后或细胞因子诱导后能够使更多的 VSEL-SCs 从骨髓中动员到外周血中,对梗死心肌发挥修复作用,但具体作用机制并不明确。

Trujillo 等^[29]研究表明鼠脑中的 VSEL-SCs 的含量较高,脑梗死模型后 VSEL-SCs 可以从骨髓中动员到外周血中,这些细胞与海马和脑室区域的神经干细胞的关系,以及骨髓和脑来源的 VSEL-SCs 对脑再生的潜在作用机制仍不明确^[30]。

因此,关于 VSEL-SCs 体内的定向分化及其对受损器官的修复作用机制仍需进一步研究。

2.2.2 临床研究 Wojakowski 等^[31]用流式细胞分选术分析了 30 名健康者和 31 名病人心肌梗死后第 1 天和第 5 天外周血中循环的 VSEL-SCs 含量,发现急性心肌梗死患者的体内循环出现 VSEL-SCs 干细胞数量增多的现象,且 50 岁以上和糖尿病病人心肌梗死后 VSEL-SCs 的动员数量明显减少,表明 VSEL-SCs 干细胞能够被身体调动起来用于对抗疾病,这种细胞在心脏组织修复过程中起到了核心作用。

Paczowska 等^[32]利用流式细胞分析、荧光共聚焦、RT-PCR、ELISA 等试验方法在临床上研究了 57 位男性病人脑卒中后外周血的 VSEL-SCs 的水平变化。研究证实了病人在脑梗死的应急状态下,外周循环且表达 CXCR4⁺ Lin⁻CD45⁻的 VSEL-SCs 水平呈现出动态变化过程,并与血浆中的 SDF-1 呈正相关性,进一步说明了病人脑卒中能够使骨髓中的 VSEL-SCs 动员到外周,并推测这些细胞能够同动物模型研究那样在脑梗死病人的脑组织再生修复上发挥巨大作用。

这为临床干细胞治疗带来了新的希望,但目前此方面的临床研究仍较少,作用机制还未明确,应用到临床治疗的道路还很漫长。

3 自体 VSEL-SCs 应用面临问题

目前利用动员自体骨髓 VSEL-SCs 干细胞治疗组织损伤的研究仍处于初级阶段,相关研究还很少,还存在许多问题有待解决。VSEL-SCs 在再生医学领域的潜在应用还需进一步考虑。

首先,最明显的问题是能够从骨髓中分离出足够数量的 VSEL-SCs。研究表明在 BMMNC (骨髓单核细胞)中的这些干细胞数量极低(105 ~ 106 个骨髓单个核细胞中才存在一个细胞),并且具有年龄依赖性,在年轻的哺乳动物的骨髓中含量较多,

含量随年龄增大而减少。而且可能是,VSEL-SCs 如果从骨髓释放,即使他们能够归巢到组织器官的损伤区域,它们也只能在很小的损伤组织中发挥再生作用,而心肌损伤和脑卒中,都是严重的组织损伤,已超出了这群稀少干细胞的有效修复能力。

其次,VSEL-SCs 的定向趋化取决于受损区域释放的归巢信号,而组织损伤后,蛋白水解酶释放的白细胞和巨噬细胞有可能使这些信号失效。例如,炎症细胞释放的金属蛋白酶(MMPs),能够降解 SDF-1 并因此破坏 VSEL-SCs 干细胞的归巢。因此,VSEL-SCs 在外周血中可能无家可归,或返回到骨髓中,或者归巢到其他器官。

再次,移植后 VSEL-SCs 是否具有功能仍不明确,研究者认为 VSEL-SCs 可能在发育过程中因甲基化等导致表面标志丢失,从而影响其干细胞特性和分化^[33]。有研究者认为它是在组织再生和肿瘤形成之间的“细红线”,这群非常原始的干细胞,如果暴露于诱变剂中,很可能引起某些癌症(如小儿肉瘤、畸胎瘤、生发肿瘤等)^[34, 35]。

4 前景

骨髓干细胞动员是新兴的细胞移植方法,具有操作简便、无创伤等优点,相对于胚胎干细胞和异体成体干细胞移植更是具有诸多优点,如无免疫排斥反应、无伦理道德争议,动物实验也证实这种方法的可行性、有效性。从成体组织中分离出来 VSE-SCs,从伦理学来看,是再生医学领域的干细胞的可选择来源,因其诱人的临床应用前景,将会促使研究人员继续进行大量的基础实验研究和临床应用的探索,相信在不久的将来,有关 VSE-SCs 在组织再生中发挥关键性作用的基本机理的开创性研究,将为未来 VSE-SCs 在临床应用中做出巨大贡献,人类将掀开组织干细胞治疗崭新的一页!

参 考 文 献

- [1] Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1395-1402.
- [2] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *J Nature*, . 2001, 410: 701-705.
- [3] Corbel SY, Lee A, Yi L, et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *J Nat Med*, 2003, 9: 1528-1532.
- [4] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem

- cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J ClinInvest*, 2003, 112: 42-49.
- [5] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *J Nature*, 2004, 428: 664-668.
- [6] Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, et al. Failure of Bone marrow cells to transdifferentiate in to neural cells in vivo. *J Science*, 2002, 297 (5585): 1297-1299.
- [7] Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4 (+) SSEA-1 (-) Oct-4 stem cells identified in adult bone marrow. *J Leukemia*, 2006, 20: 857-869.
- [8] Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, et al. Small Stem Cells in Adult Tissues: Very Small Embryonic-Like Stem Cells Stand Up! *J Cytometry*, 2009, 75A: 4-13.
- [9] Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, et al. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4 (+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *J Leukemia*, 2007, 21 (5): 860-867.
- [10] Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, et al. Very small embryonic-like stem cells: Characterization, developmental origin, and biological significance. *J Exp Hematol*, 2008, 36: 742-751.
- [11] Zuba-Surma EK, Kucia M, Abdel-Latif A, et al. Morphological characterization of Very Small Embryonic-Like stem cells (VSELs) by Image Stream system analysis. *J Cell Mol Med*, 2008, 12: 292-303.
- [12] Kucia M, Wysoczynski MJ, Ratajczak J, et al. Identification of very small embryonic-like (VSEL) stem cells in bone marrow. *J Cell Tissue Res*, 2008, 33: 125-134.
- [13] Zuba-Surma EK, Klich I, Greco N, et al. Optimization of isolation and further characterization of umbilical-cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs). *J Eur J Haematol*, 2010, 84: 34-46.
- [14] Zuba-Surma EK, Ratajczak MZ. Overview of very small embryonic-like stem cells (VSELs) and methodology of their identification and isolation by flow cytometric methods. *J Curr Protoc Cytom*, 2010, Chapter 9: Unit9-29.
- [15] Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4 + tissue-committed stem cells. *J Biol Cell*, 2005, 97: 133-146.
- [16] Lu HZ, Wang YX, Li Y, et al. Proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells induced from rat embryonic neural precursor cells followed by flow cytometry. *J Cytometry A*, 2008, 73A: 754-760.
- [17] Shin DM, Liu R, Klich I, et al. Molecular characterization of isolated from murine adult tissues very small embryonic/epiblast like stem cells (VSELs). *J Mol Cells*, 2010, 29: 533-538.
- [18] Zuba-Surma EK, Kucia M, Wu W, et al. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: Image Stream based morphological analysis and distribution studies. *J Cytometry A*, 2008, 73A (12): 1116-1127.
- [19] Kucia M, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, et al. Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *J Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7 (10): 1499-1514.
- [20] Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4 (+) SSEA-1 (+) Oct-4 + stem cells identified in adult bone marrow. *J Leukemia*, 2006, 20 (5): 857-869.
- [21] Caraux A, Perez-Andres M, Larroque M, et al. Mobilization of plasma cells in healthy individuals treated with granulocyte colony-stimulating factor for haematopoietic stem cell collection. *J Immunology*, 2011, 132 (2): 266-272.
- [22] Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *J Circ Res*, 2003, 92 (2): 139-510.
- [23] Ratajczak MZ, Machalinski B, Ratajczak J, et al. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4 (+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *J Leukemia*, 2007, 21: 860-867.
- [24] Ciulla M, Lazzari L, Pacchiana R, et al. Homing of peripherally injected bone marrow cells in rat after experimental myocardial injury. *J Haematologica*, 2003, 88 (6): 614-621.
- [25] Dawn B, Tiwari S, Kucia MJ, et al. Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *J Stem Cells*, 2008, 26 (6): 1646-1655.
- [26] Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, et al. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *J Stem Cells*, 2008, 26 (8): 2083-2092.
- [27] Zuba-Surma EK, Guo Y, Taher H. Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 2010, 12: [Epub ahead of print].
- [28] Zuba-Surma EK, Kucia M, Dawn B, et al. Bone marrow-derived pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) are mobilized after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44 (5): 865-873.
- [29] Trujillo C, Schwandt T, Martins A, et al. Novel perspectives of neural stem cell differentiation: From neurotransmitters to the reapeutics. *J Cytometry A*, 2009, Special Issue.
- [30] Lu HZ, Wang YX, Li Y, et al. Proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells induced from rat embry-

onic neural precursor cells followed by flow cytometry. J Cytometry A, 2008, 73A: 754-760.

- [31] Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, et al. Mobilization of Bone Marrow-Derived Oct-4 + SSEA-4 + Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol, 2009, 53: 1-9.
- [32] Martins AH, Alves JM, Trujillo CA, et al. Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. J Cytometry A, 2008, 73A: 361-368.
- [33] Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, et al. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. J Stroke, 2009, 40: 1237-1244.

2009, 40: 1237-1244.

- [34] Kucia M, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, et al. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. J Physiol Pharmacol, 2006, 57(5): 5-18.
- [35] Liu C, Chen Z, Zhang T, et al. Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. J Neoplasia, 2006, 8: 716-724.
- [36] Kucia M, Zuba-surma EK, Wysoczynski M, et al. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL-SC) stem cells in adult bone marrow. J Physiol Pharmacol, 2006, 57: 5-18.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价13元,全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。