

外周血单个核细胞来源的多潜能细胞的研究进展

解英 陈斌 汪虹 王宽 李冉

Advances in the research of peripheral blood mononuclear cell-derived multipotential cell Xie Ying, Chen Bin, Wang Hong, Wang Kuan, Li Ran. Department of Burns, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Burn Institute of Yunnan Province, Kunming 650101, China

Corresponding author: Wang Hong, Email: 1953602234@qq.com

【Abstract】 Mononuclear cell -derived multipotential cell (MOMC) is a unique cell population that derived from circulating CD14⁺ mononuclear cell, with phenotypic characteristics of CD14⁺, CD45⁺, CD34⁺, as well as type I collagen. It can be induced to differentiate into a wide range of mesenchymal lineages, including endothelium-like cells, myocardium-like cells, neuron-like cells, osteoid cells, chondroid cells, lipid cells, myoid cells, epidermoid cells, and hepatoid cells. More strikingly, MOMC is easy to be obtained, and it can expand easily in vitro, which can be transplanted autologously without ethical limitations. MOMC is an ideal source of cell therapy for tissue regeneration and wound repair.

【Key words】 Cell differentiation; Mononuclear cell-derived multipotential cells; Cell therapy; Tissue regeneration

Fund program: Regional Science Foundation of the National Natural Science Foundation of China (81160238)

【关键词】 细胞分化; 单个核细胞来源的多潜能细胞; 细胞治疗; 组织再生

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(81160238)

外周血单个核细胞中存在一些独特的祖细胞群体,包括造血干细胞^[1]、血管内皮祖细胞(EPC)^[2]、间充质干细胞^[3]、循环纤维细胞(fibrocytes)^[4]等,这些细胞因能在适宜条件下分化为具有不同功能的成熟细胞,长期受到研究者们的关注。近年来,研究者发现一种来源于外周血的干/祖细胞——单个核细胞来源的多潜能细胞(MOMC),其具有可从外周血获取并体外扩增、表型独特和多向分化的特性,可能为自体干/祖细胞在组织再生及创伤修复的应用如自体移植等方面带来新方向,现就有关研究内容综述如下。

1 MOMC 的来源

2003年,Kuwana等^[5]首先报道将外周血单个核细胞培养于纤维连接蛋白(FN)包被的培养皿7d,绝大部分贴壁细胞(超过95%的比例)均具有表达CD14、CD45、CD34及I型

胶原蛋白等的特征,再将单个核细胞体外诱导培养,其可分化为骨样细胞、软骨样细胞和脂肪样细胞等。因此,这群具有间充质干/祖细胞特性的细胞被命名为单个核细胞来源的间充质祖细胞(MOMP)。进一步研究证实,MOMP可诱导分化为心肌样细胞和神经样细胞^[6-7],2006年,该群细胞被更名为MOMC^[8]。

循环CD14⁺单个核细胞来源于骨髓造血干细胞,存在于外周血中。为了进一步确认MOMC是否来源于CD14⁺单个核细胞,研究者将标记有绿色荧光染料的CD14⁺单个核细胞与未标记的CD14⁻单个核细胞共同培养于FN包被的培养皿中,结果显示仅有荧光标记的细胞显示纤维细胞样形态且表达CD34。从而说明,外周血CD14⁺单个核细胞是MOMC的前体细胞^[9]。

2 影响 MOMC 来源与产生的因素

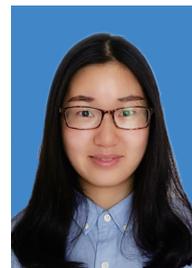
2.1 FN 与基质细胞衍生因子 1(SDF-1)

Seta和Kuwana^[9]研究显示,FN是CD14⁺单个核细胞产生MOMC的条件之一。Kuwana等^[5]采取CD14⁺单个核细胞单独培养、将其与含血小板的CD14⁻单个核细胞共培养、将其与不含血小板的CD14⁻单个核细胞共培养,培养皿均用FN包被。结果显示,与含血小板的CD14⁻单个核细胞共培养时,CD14⁺单个核细胞可产生梭形的贴壁细胞,这些贴壁细胞不仅能表达干细胞标志物(如CD34),还能被诱导分化为骨样、软骨样、脂肪样、内皮样细胞。由此推测,在CD14⁻单个核细胞存在的条件下,血小板产生的可溶性因子是CD14⁺单个核细胞分化为MOMC的重要前提。

血小板产生的哪一种可溶性因子影响CD14⁺单个核细胞分化为MOMC?研究者从血小板释放的16种细胞因子(分子量小于30×10³)锁定出5种,即调节活化蛋白、bFGF、巨噬细胞炎症蛋白1a、单核细胞趋化蛋白3和SDF-1,最终观察到仅SDF-1才能最终促使CD14⁺单个核细胞分化为MOMC^[10]。SDF-1是一种趋化因子,其受体为趋化因子受体4(CXCR4)。采用CXCR4拮抗剂AMD3100能成功抑制CD14⁺单个核细胞分化为MOMC^[10]。为了测试CXCR4水平的高低是否会影响到此种分化,研究者将高表达CXCR4和低表达CXCR4的CD14⁺单个核细胞分别培养于含有血小板的FN包被培养皿中,7d后高表达CXCR4的CD14⁺单个核细胞产生的贴壁细胞数量更多^[10]。

2.2 机体处于非正常环境可能促进 MOMC 的产生与分化

有研究者认为,正常机体环境下循环CD14⁺单个核细胞未见MOMC分化。若机体处于非正常环境下,如组织损伤或发生炎症时,循环CD14⁺单个核细胞就可能感应到这些非正常信号而渗透到损伤炎症区域分化为MOMC,MOMC又因感应到其所处组织释放的信号而分化为相应的间质细胞,进而取代损伤细胞,维持组织稳态^[5]。



DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.013

作者单位:650101 昆明医科大学第二附属医院烧伤科,云南省烧伤研究所(解英、汪虹、王宽、李冉);美国塔夫茨大学医学院 Lahey 医院医疗中心整形外科(陈斌)

通信作者:汪虹,Email:1953602234@qq.com

2.3 异质性细胞群体

有研究者认为,由于仅有一部分 MOMC 能分化为所诱导的细胞系,推测 MOMC 可能由多种祖细胞组成,而实际有分化能力的那部分 MOMC 比例较低^[11]。也许通过克隆出 MOMC 中的单个细胞可证实这一理论,但目前受到技术方面的限制未能实现^[5]。

2.4 MOMC 可能由一些细胞去/转分化获得

有研究者认为,可用去分化现象来解释具有多向分化潜力的 MOMC 产生,即一些细胞在一定条件下可转变为更原始的早期细胞,从而拥有更宽泛的分化能力;也可用转分化现象来解释,即有造血特性的循环单个核细胞能分化为另一种新的细胞类型^[12]。因此,尽管看似细胞在体内的分化是一个序贯性进展过程,但是也有证据表明细胞的分化并非不可逆转。

3 MOMC 的生物学特性

虽然 MOMC 与其他外周血起源的祖细胞(如 EPC、循环纤维细胞等)均呈梭形^[9],但通过电镜观察到 MOMC 自身还具有独特的混合结构——吞噬细胞的早期溶酶体和类似伪足的细胞表面突起、内皮细胞的杆状微小管体、间质细胞突出的中间丝和小脂滴等^[9]。而流式细胞检测和免疫组织化学染色证实 MOMC 可表达单核细胞标志物(如 CD45、CD11b、CD14)^[13]、干细胞标志物(如 CD34、CD105)^[14]、内皮细胞标志物[如 CD144、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR1)]、间质性细胞产物(如 I、III 型胶原蛋白及 FN、波形蛋白)^[9]等。由此可见,MOMC 独特的表型谱不同于以前发现的任何一种干/祖细胞。此外,MOMC 还具有独特的体外增殖规律。在体外培养 MOMC 时,第 1~3 代细胞增殖明显,但第 4 代细胞的增殖速率减慢,第 5 代细胞基本停止增殖^[9]。由此表明,MOMC 虽能进行自我复制,但增殖能力有限^[9]。

3.1 分化为内皮样细胞

有研究表明,MOMC 可在血管内皮生长因子(VEGF)的诱导下分化成为具有成熟表型、典型形态且有功能性的内皮样细胞^[9]。体外实验观察到,培养 1 周的 MOMC 不但会形成许多棒管状小体(Weibel-Palade 小体)样结构,而且几乎所有 MOMC 均能表达内皮细胞标志物,例如 CD31、CD144、VEGFR1、VEGFR2、血管性血友病因子、内皮型一氧化氮合酶等,同时随着培养时间的延长,其造血系标志物 CD45 和 CD14 的表达显著下降^[9]。体内研究也证实,将 MOMC 注射到重症联合免疫缺陷小鼠皮下可形成大量血管,且超过 40% 的新生肿瘤血管含有 MOMC 分化来的内皮样细胞^[9]。

3.2 分化为心肌样细胞

有研究者将 MOMC 和胚胎鼠心肌细胞共同培养,观察到 MOMC 形态逐步从梭形变为圆形再到多角形,并检测到 MOMC 表达心肌特异性转录因子、心肌特异性结构蛋白(如横纹肌肌动蛋白和肌钙蛋白 I)和心房钠尿肽(仅有心房肌细胞能分泌)^[9]。培养期间,MOMC 所表达的 CD45 和 CD14 逐渐下调并最终消失^[9]。有趣的是,电生理研究显示共培养 3 周的 MOMC 除了自身产生低频率的自主搏动外,还与共培养的鼠心肌细胞形成同步收缩。由此表明,MOMC 可分化为

有功能的心肌样细胞^[9]。

3.3 分化为神经元样细胞

有研究者采用共培养方法证实,与胚胎鼠大脑神经元共同培养的 MOMC 可分化为神经元样细胞^[13]。在培养过程中,MOMC 除了逐渐转变为多极神经元样形态外,早期可表达神经外胚层转录因子,晚期还可表达神经元特异性 RNA 结合蛋白和神经元特异性核蛋白。同样,在诱导分化培养过程中,CD45 和 CD14 也逐渐丢失。这些证据都表明 MOMC 可被诱导分化为神经元样细胞,尽管分化能力较低^[9]。

3.4 分化为成骨样细胞

若将 MOMC 置于成骨诱导培养基中,可最终获得成骨样细胞。培养中,细胞形态由梭形逐渐变为立方体,碱性磷酸酶染色显示几乎每个贴壁细胞都因钙沉积而显色^[14]。当成骨样细胞逐渐表达骨唾液酸糖蛋白 II 和骨钙蛋白 mRNA 时^[15],CD34、CD14、CD45 的表达随之减弱^[5]。

3.5 分化为软骨样细胞

研究表明,只有在 TGF- β_1 存在条件下,MOMC 才可分化为软骨样细胞。RT-PCR 检测到软骨样细胞表达关节软骨特异性产物 II 型胶原蛋白和 X 型胶原蛋白^[9]。当这些特异性产物表达上调时,CD14、CD45 的表达消失,而 CD34 的表达仍存在^[5]。

3.6 分化为肌样细胞

MOMC 可被诱导分化为肌样细胞^[5]。当对 MOMC 进行肌生成诱导处理时,细胞由梭形变为细长形,RT-PCR 检测到肌特异性转录因子肌细胞生成素时,CD34、CD14、CD45 的表达虽然未消失却也降低了^[5]。

3.7 分化为脂肪样细胞

有研究者通过电镜观察到 MOMC 中存在小脂滴,推测 MOMC 可分化为脂肪样细胞。进一步研究结果表明,50%~80% 的贴壁细胞可分化为脂肪样细胞,并观察到脂性液泡在体积上缓慢增大,在数量上逐渐增多,且被油红染色^[5]。当过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和脂肪酸结合蛋白 aP2 的 mRNA 水平显著上调时,CD14、CD45 的表达消失,CD34 的表达仍存在^[5]。

3.8 分化为表皮样细胞和肝样细胞

Zhao 等^[6]观察到,70% 的 MOMC 在 EGF 诱导下可分化为表皮样细胞,同时表达表皮细胞标志物 E 钙黏蛋白。他们还观察到,将 MOMC 培养于含肝细胞生长因子的培养基中,MOMC 会由梭状逐渐变为扁平卵圆状,免疫组织化学染色显示白蛋白、甲胎蛋白、胆管上皮特有的细胞角蛋白 7 生成,由此表明 MOMC 可分化为肝样细胞。而随着 MOMC 分化为表皮样细胞和肝样细胞时,CD34、CD14、CD45 的表达也明显降低。

以上实验说明 MOMC 具有多向分化潜能。而在 MOMC 的分化过程中存在一个共同现象,即随 MOMC 分化接近成熟间质细胞时,MOMC 造血系标志物 CD14、CD45、CD34 的表达大多降低或消失。

值得注意的是,经 MOMC 诱导分化的成骨样细胞、肌样细胞、脂肪样细胞数量均显著少于 MOMC 的原始数量,然而,由 MOMC 诱导分化而得的软骨样细胞数量却是原始

MOMC 数量的 2~3 倍^[5]。由此可见, MOMC 的分化能力强弱不等, 在大多数间质细胞系分化中, MOMC 的分化能力是有限的。

4 MOMC 的研究展望

从现有研究资料来看, 对 MOMC 的研究虽然取得了较大进展, 但依旧存在一些问题: (1) MOMC 多向分化信号转导机制、调控和分子生物学基础尚不清楚。关于 MOMC 分化能力的研究还仅局限在免疫化学和 PCR 技术层面的可视性细胞形态变化上, 对其多向分化的生物学机制探讨甚少^[5]。(2) MOMC 分化为特异性间质细胞的能力与时间有限, 诱导分化效率尚不太理想。(3) MOMC 获取和体外培养扩增的方法尚需优化。(4) MOMC 的体外分化研究较多, 而关于其体内分化的研究甚少。(5) 尚缺少 MOMC 治疗的临床安全性评估, 如由 MOMC 诱导分化的细胞是否都具有正常的结构和功能, 分化后能否或有多少比例可归巢到需要修复的相应组织, 是否会伴随不良反应或并发症等。

针对这些问题, 可从以下几个方面深入开展 MOMC 的有关研究: (1) MOMC 可能影响缺血性卒中的发生发展^[10], 例如在缺血性卒中小鼠体内移植 MOMC, 可促进新生血管形成而增强小鼠机能恢复^[16]。(2) MOMC 具有干/祖细胞的功能特性, 其可作为细胞治疗来源用于组织修复重建、治疗成骨不全症、补充免疫细胞对抗肿瘤及治疗因脊髓损伤、中风、痴呆而损害的神经组织等疾病^[6]。(3) 靶向趋化。由活化血小板而产生的 SDF-1 不仅能促使 CD14⁺ CXCR4 分化为 MOMC^[10], 还能进入微环境募集 EPC 参与血管损伤修复^[17], 且 SDF-1—CXCR4 轴可介导干/免疫细胞在机体转移^[18-19]。因此, 由 SDF-1 调节产生的 MOMC 可能与创面修复、免疫调节有关。

参考文献

- [1] Schmitt M, Hoffmann JM, Lorenz K, et al. Mobilization of autologous and allogeneic peripheral blood stem cells for transplantation in haematological malignancies using biosimilar G-CSF [J]. *Vox Sang*, 2016, 111(2):178-186. DOI:10.1111/vox.12397.
- [2] Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(1):10-16. DOI: 10.1002/jcp.24423.
- [3] Li M, Zhao Y, Hao H, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for nonhealing wounds: today and tomorrow [J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(4):465-482. DOI: 10.1111/wrr.12304.
- [4] Wright AK, Brightling CE. Circulating fibrocytes: will the real fibrocyte please stand up? [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5):1625-1626. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.01.023.
- [5] Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, et al. Human circulating CD14⁺ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 74(5):833-845. DOI:10.1189/jlb.0403170.
- [6] Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5):2426-2431. DOI:10.1073/pnas.0536882100.
- [7] Seta N, Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14⁺ monocytes [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(7):557-563. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.03.015.
- [8] Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, et al. Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12):2733-2743. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0026.
- [9] Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors [J]. *Keio J Med*, 2007, 56(2):41-47.
- [10] Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74246. DOI: 10.1371/journal.pone.0074246.
- [11] Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications [J]. *World J Stem Cells*, 2010, 2(4):67-80. DOI: 10.4252/wjsc.v2.i4.67.
- [12] Xie F, Gong K, Li K, et al. Reversible immortalization enables seamless transdifferentiation of primary fibroblasts into other lineage cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(16):1243-1248. DOI: 10.1089/scd.2016.0035.
- [13] Yang J, Zhang L, Yu C, et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases [J]. *Biomark Res*, 2014, 2(1):1. DOI: 10.1186/2050-7771-2-1.
- [14] Cimato TR, Furlage RL, Conway A, et al. Simultaneous measurement of human hematopoietic stem and progenitor cells in blood using multicolor flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(5):415-423. DOI: 10.1002/cyto.b.21354.
- [15] Zhang Y, Shuang Y, Fu H, et al. Characterization of a shorter recombinant polypeptide chain of bone morphogenetic protein 2 on osteoblast behaviour [J]. *BMC Oral Health*, 2015, 15(1):171. DOI: 10.1186/s12903-015-0154-z.
- [16] Hattori H, Suzuki S, Okazaki Y, et al. Intracranial transplantation of monocyte-derived multipotential cells enhances recovery after ischemic stroke in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(2):479-488. DOI: 10.1002/jnr.22755.
- [17] Zhu Y, Hoshi R, Chen S, et al. Sustained release of stromal cell derived factor-1 from an antioxidant thermoresponsive hydrogel enhances dermal wound healing in diabetes [J]. *J Control Release*, 2016, 238:114-122. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.07.043.
- [18] Walsh TG, Harper MT, Poole AW. SDF-1 α is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4 [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(1):37-46. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.09.021.
- [19] Di MS, Trotta AM, Brancaccio D, et al. Exploring the N-terminal region of C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12): identification of plasma-stable cyclic peptides as novel, potent C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) antagonists [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(18):8369-8380. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00695.

(收稿日期:2016-01-18)

(本文编辑:莫愚)

本文引用格式

解英,陈斌,汪虹,等. 外周血单个核细胞来源的多潜能细胞的研究进展的研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(12):762-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.013.

Xie Y, Chen B, Wang H, et al. Advances in the research of peripheral blood mononuclear cell-derived multipotential cell [J]. *Chin J Burns*, 2016, 32(12):762-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.013.