

胎盘来源干细胞研究进展

刘太行 王应雄 丁裕斌

(重庆医科大学公共卫生与管理学院 生殖生物学实验室,重庆 400016)

【摘要】 干细胞应用于再生医学治疗多种疾病近年来已取得了许多重大突破,然而由于种细胞的来源和伦理学等问题严重限制了其快速发展。胎盘不仅能为胎儿的生长和发育提供营养物质,同时作为多种类型干细胞的存储器,为干细胞治疗提供了新的种源,且来源广泛、易于分离、不存在伦理争端。由于胎盘干细胞优良的分化潜能及独特的免疫学特性,被广泛用于治疗多种疾病研究中。本文就目前关注较多的胎盘间充质干细胞和胎盘造血干细胞的生物学特性、临床应用潜力及未来发展趋势做论述。

【关键词】 胎盘间充质干细胞;胎盘造血干细胞;生物学特性;免疫调控

【中图分类号】 R714.56 **【文献标识码】** A

人类胎盘(placenta)由胎儿的丛密绒毛膜与母体的基蜕膜共同组成的圆盘形结构,是母体与胎儿间物质交换的器官。每个人出生之前都依赖胎盘生存,胎盘不仅担负着胎儿的肺和肾的功能,还负责产生重要的激素,维持正常妊娠。虽然,“胎盘是人们了解得最少的一种人类器官,在科学界人们大多忽视了胎盘的存在”^[1];但是,作为人体的“免疫特区”,胎盘组织中进行的干细胞分离和功能研究已经进入了一个新的时代^[2]。多能性胎盘干细胞用来移植修复受损或病变器官不仅免疫原性弱,同时对机体免疫还有一个负调控作用,这就给胎盘干细胞的应用提供了一个非常大的发展空间,也被大家寄予了无限厚望。目前科学发现的四类主要胎盘干细胞中,得到广泛研究和临床实验的主要是胎盘间充质干细胞和胎盘造血干细胞。本文将就这两种胎盘来源的干细胞特征及未来在临床上的应用潜力进行介绍并分析其生物学特性。

1 胎盘间充质干细胞(PMSCs)

胎盘间充质干细胞(placenta-derived mesenchymal stem cells, PMSCs)是一种多能干细胞,来源于胚胎发育早期的中胚层。Jaroscak等^[3]首先报道了关于胎盘来源的干细胞,发现胎盘贴壁细胞与骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)表达

基本相似的细胞表面标志,都具有多向分化潜能,但胎盘贴壁细胞的同质性不如BMSC。随后,大量的研究发现胎盘的各个部位,如脐带、羊膜、绒毛膜、以及底蜕膜均含有间充质干细胞。不同组织来源的间充质干细胞有共同的特征,但也存在一些不同之处。目前PMSCs因具有显著的增殖和多向分化潜能以及独特的免疫学特点,得到广泛而深入的研究。

1.1 PMSCs的扩增与分化 特征 PMSCs在形态上与BMSCs类似,为典型的成纤维细胞样,并呈漩涡状生长。PMSCs易于分离扩增,体外倍增能力旺盛,体外扩增至20代,细胞形态不发生明显改变,在指数生长期的倍增时间约为21~25小时^[4]。PMSCs的扩增能力明显强于成年(平均年龄30岁)健康女性志愿者的BMSCs。PMSCs表达典型的间充质抗原,如CD90、CD73、CD105、CD13、CD44、CD29、CD166、CD117、HLA-A、-B、-C、CD49e、CD29等;缺乏造血细胞表面标志CD34、CD45、CD14、HLA2DR和上皮细胞表面标志vWF、Flk21、CD31、KDR以及共刺激因子CD80、CD86、CD40L和HLA-DR等。PMSCs^[5]还可表达某些胚胎干细胞表面标记SSEA24、TRA21261、TRA21280,提示PMSCs可能是非常原始的细胞群,比成体干细胞(adult stem cells, ASC)具有更广泛的自我更新和多系分化能力。PMSCs中存在多潜能标志物Sox-2、OCT-4、Nanog和SSEA-4^[6],还表达器官特异性基因renin、nestin、GFAP、amylase等基因,但

Rex21 的表达随细胞代数增加而消失。体外培养的实验研究发现,在不同的诱导条件下,PMSCs 可分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和神经元,表明 PMSCs 具有广泛的分化潜能^[7]。PMSCs 即使扩增 1 亿倍仍能保持其多向分化能力。由于 PMSCs 具有强大的增殖能力和在适宜的体内或体外环境下分化为多种细胞的能力,因而胎盘可作为一种重要的参与组织再生的细胞库,即在组织损伤引起的特殊信号作用下,PMSCs 迁移到受损部位,在局部聚集增殖,依据不同的损伤信号沿着不同途径分化。

1.2 PMSCs 的免疫学特性 PMSCs 在免疫学上有其突出的特点:①免疫抑制作用:PMSCs 可抑制 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及 NK 细胞的部分免疫功能。其作用机制包括抑制免疫细胞的增殖、抑制可溶性细胞因子、抑制细胞毒性物质的分泌。这就使得治疗用的 PMSCs 不仅可以用于自体,也可以用于异体。②“免疫赦免”作用:PMSCs 具有抑制同种异体免疫反应、降低移植物抗宿主反应的作用,在某程度上,自身能躲过免疫防御机制的作用,即“免疫赦免”^[8]。③强大的免疫调节作用:PMSCs 具有较低免疫原性的特点,不表达 CD80、CD86 和 CD40 等 T 淋巴细胞活化所需的共刺激分子,仅表达 MHC-I。虽然 MHC-I 可以激活异物反应 T 细胞,但是由于缺乏协同刺激因子,导致信号传导受限,因此,最终免疫细胞对 PMSCs 无细胞免疫反应^[9]。此外,PMSCs 可以与多种免疫细胞相互作用,抑制有丝分裂原或同种异体抗原诱导淋巴细胞增殖的能力,阻断单核细胞成熟为树突状细胞的能力,是其免疫调节效应的另一个实例^[6]。强大的免疫调节作用使得移植的 PMSCs 在修复受损组织的同时,还可以调节患者的免疫状态。④低免疫原性:PMSCs 具有低免疫原性,与同种异体人外周血单核细胞(PBMC)及异基因动物猪的 PBMC 共培养,无刺激细胞增殖的现象,并通过非直接接触的作用方式抑制人同种异体混合淋巴细胞反应(MLR),这避免了胚胎干细胞等全能干细胞致癌性风险。

1.3 PMSCs 在相关疾病治疗中的实验与临床研究 PMSCs 由于其独特的干性及免疫调节特性,被广泛应用于免疫介导性炎症的治疗及移植修复受损

或病变器官。Chen 等^[10]发现在促进分化为脂肪细胞和成骨细胞的条件下培养。使用包含碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),全反式维 A 酸(RA),抗坏血酸(AA)和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)的混合物,在体外诱导 PMSCs 成为多巴胺神经元。而且,它们可以诱导成为脂肪细胞和骨细胞。当用 bFGF、RA、AA 和 IBMx 诱导 PMSCs 时,它们的形态变化与神经元样细胞相似。Park 等^[11]将分离的 PMSCs 注入帕金森大鼠模型的纹状体内,在 24 周的观察周期内可见小鼠的运动功能几乎恢复正常。免疫组化及 PET 扫描可见分泌多巴胺的细胞生成,证实了注入的细胞在体内能向神经细胞分化。体外实验结果显示了 PMSCs 的分化潜能和有效的旁分泌效应。PMSCs 在体内存活至少 3 周,并能促进新毛细血管的形成,小动脉的增加及各种促血管生成因子的分泌,从而加速缺血恢复。PMSCs 直接通过分化为特定细胞和分泌相关细胞因子参与血管生成^[12]。Reddy 等^[13]发现与脐带来源的干细胞、胎儿骨髓来源的干细胞以及脂肪组织来源的干细胞比较,PMSCs 显示了最强的成骨能力。PMSCs 是人体微环境的重要组成部分,移植 PMSCs 可以改变造血微环境,重建免疫系统,促进造血功能恢复,与造血干细胞共移植能可能显著提高白血病和难治性贫血等的治疗效果。

目前国际上已经有很多胎盘来源干细胞的临床研究,在美国国立卫生研究院的最大临床试验注册库 ClinicalTrials.gov 网站上,至 2016 年,胎盘干细胞的临床实验已有 22 项,主要集中在北美,其中中国境内有 4 项。治疗相关的疾病包括:多发性硬化、重型再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、白血病等恶性或非恶性血液疾病,还有 2 型糖尿病、特发性肺纤维化、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病等非血液系统疾病^[14]。

2 胎盘造血干细胞(placenta-derived hematopoietic stem cell, PHSCs)

胎盘具有造血功能的观点早已有之(图 1),Till 和 McCulloch^[15]首次提出了胎盘含有大量具有高度增殖潜力的无性系造血细胞。Dancis 等^[16]第一

次证明了小鼠胎盘中含有造血前体细胞。此后, King 等^[17]发现胎盘绒毛膜存在基质和血管前体细胞,其后 Demir 等^[18]从胎盘绒毛膜鉴别出分化成血液细胞和血管细胞的血液血管干细胞。另外,相对

于骨髓来说,胎盘具有更适合造血干细胞增殖的内环境——包括造血因子的表达、血管内皮的类型、血流切力影响、表面分子的改变、血氧浓度等^[19],都进一步说明胎盘中可能存在 PHSCs。

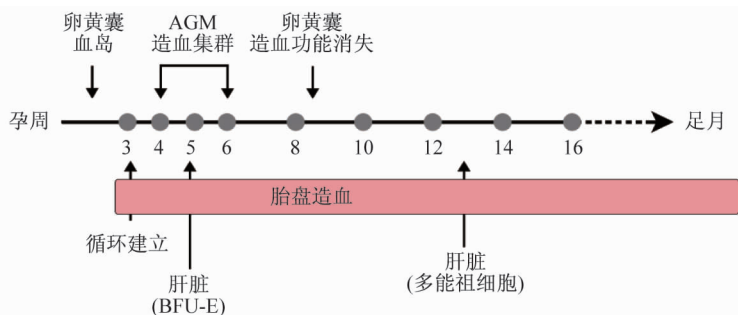


图1 人类胎儿及胎盘的造血功能

以人类妊娠起始、妊娠中期到足月期的孕周数为时间轴,卵黄囊、AGM(人主动脉-性腺-中肾)造血集群、肝脏及胎盘中造血干细胞出现的时空顺序。红细胞系爆裂样生成单位(BFU-E)代表最早的红细胞祖细胞,多能性祖细胞能产生红细胞及髓样谱系细胞^[19]。

研究还发现 SALL4 和 BMI-1 等造血相关基因在胎盘中高表达^[20]。转录因子 Evi1 作为造血干细胞自我更新及多向再植入能力的标志因子之一,也在胎盘中显著表达^[21]。小鼠的胎盘从 E9 开始成为造血祖细胞来源,造血干细胞数量在 E12.5 时期明显上升,而在 E15.5 之后的胎盘中很少有造血干细胞发现,此时干细胞开始迁移至胎肝。与鼠不同的是,人类从怀孕第 6 周开始有造血干/祖细胞的发现,在终末期胎盘仍可以发现,提示人类胎盘是造血干细胞的重要来源之一。此后,一系列经典实验证明了胎盘是一个自主的造血干细胞的起源,而非由其他造血位点产生然后定植于胎盘。Zeigler 等^[22]及 Corbel 等^[23]进行的两项单独的研究显示,在建立循环之前分离的尿囊和绒毛膜具有在外植体培养之后产生髓细胞和明确的红细胞的潜力,提示尿囊和绒毛膜具有独立的造血潜能。这些结果均表明胎盘不仅是造血干细胞龕,而且也是造血细胞的源泉。

2.1 PHSCs 的生物学特性 PHSCs 表达许多与胎肝和骨髓来源造血干细胞相同的标记因子,包括 CD34 和 c-kit。而且,鼠胎盘造血干细胞表达的

Sca-1 也在成体骨髓造血干细胞中表达。人类的造血干细胞真正的表面标记至今仍没有完全确定,但在试验及临床应用中,人们常常把 CD34 抗原作为重要标志来鉴定和分离人造血干/祖细胞。Serikov 等^[24]第一次证明人类胎盘可以提供大量的 PHSCs,这些细胞表达其他造血前体标志物如 CD90、CD38 和 CD133,但不表达 CD31 或 KDR。

胎盘获得的 CD34⁺细胞百分率是脐带血的 8.8 倍,CD34⁺/CD38⁻细胞和 CD34⁺/CD38⁺细胞百分率分别是脐带血的 4.6 倍和 11.9 倍,说明胎盘组织中含有比脐带血更丰富的 PHSCs。另外,胎盘中的淋巴细胞总数、T 细胞(CD3⁺/CD2⁺)、B 细胞(CD19⁻)、Th 细胞(CD3⁺/CD4⁺)及 Th/Ts 比值均明显低于脐带血,而 CD8⁺/CD28⁻抑制性 T 细胞则明显高于脐带血,说明 PHSCs 的免疫原性要低于脐血和外周血造血干细胞。

目前,人类足月的胎盘是一个有活性且具有功能的造血干细胞很好的来源,利用胎盘循环及干细胞受体阻断的方法,可以在无菌状态下以非破坏性的方法轻易地取得大量的造血干细胞。动物实验也更进一步证明 PHSCs 可以在免疫缺乏的小鼠重建它的造血系统。利用 Serikov 等^[24]发展出来的方法取得 PHSCs 可以增强脐带血为主的治疗或取代骨髓的移植,都将极大地改变整个移植领域。

2.2 PHSCs 的临床应用潜力 PHSCs 是存在于胎盘组织中的一群原始造血细胞,可以分化形成各

种血细胞(红细胞、白细胞、血小板等),是高度未分化的细胞,也是所有造血细胞和免疫细胞的祖细胞,可潜在用于可治疗血液疾病,如急性白血病、再生障碍性贫血、地中海贫血和淋巴瘤,部分恶性肿瘤,部分遗传性疾病等。PHSCs 也被用于其他疾病的治疗试验,例如,PHSCs 中的 CD34⁺ 细胞能够迁移到脊髓受损部位,并向神经元和神经胶质细胞方向分化,从而修复脊髓损伤。此外,PHSCs 移植在治疗慢性进行性舞蹈病、脑梗死、阿尔茨海默病、肌萎缩性(脊髓)侧索硬化、大脑损伤和脊位损伤也在部分实验中取得疗效。PHSCs 中还存在着大量的较幼稚干细胞,向血液系统之外的其他系统分化,如在肝细胞、心肌、皮肤、软骨和骨骼肌等。除以上疾病外,还被用于1型糖尿病、严重联合免疫缺陷等代谢障碍和免疫缺陷性疾病的治疗^[25]。PHSCs 以其采集方便、实物储存、配型几率高以及排异反应小等优势被视为骨髓的替代。

2.2.1 取材来源容易 过去胎盘常作为废物被丢弃,故 PHSCs 的提取对产妇及新生儿没有任何影响。活的 PHSCs 也同样可以由整个冷冻的胎盘得到,由胎盘组织分离的细胞在试管内可以分化成所有血液的细胞。分离的 PHSCs 保存在专业的低温冷冻液氮罐中,可以保证其安全和可用性。

2.2.2 配型几率高 异体造血干细胞移植需要组织配型相合,无关供体间配型相合的几率仅为 15~20 万分之一。即便主要组织相容性抗原相合,在很多亚位点也有所不同,也会出现免疫排斥反应,影响移植效果,移植成功率低。而自体应用具有完美的组织配型,不会出现免疫排斥反应,移植的成功率高,对于同家族亲属来讲,也有 1/2~1/4 配型相合的几率,配型率高。

2.2.3 数量丰富 脐带血来源造血干细胞存在 30kg 重使用的瓶颈;骨髓、动员后外周血提取的造血干细胞数量可供 1 个成人使用;胎盘造血干细胞数量丰富,从胎盘组织中直接提取的造血干细胞是脐带血的 8~10 倍,可能供小孩自用几次或 1~2 个成人患者进行治疗。PHSCs 有效地解决了移植时骨髓或者动员后外周血来源不足、脐带血数量不够等技术难题,是替代骨髓的珍贵生物资源。

2.2.4 PHSCs 更为早期,增殖能力强,排斥反应低、无伦理障碍等优点。

3 结语

综上所述,胎盘是包括造血干细胞和间充质干细胞在内多种干细胞的存储器官,这些干细胞具有较强的自我更新及多向分化潜能,免疫原性缺乏或较低,且具有免疫调节的特性;更重要的是,这些干细胞相对来说更容易获取和分离,无伦理方面担忧。因此,对于一系列以干细胞为基础的治疗方法来说,胎盘来源干细胞在同种自体及同种异体移植治疗中具有更广阔的应用前景。但是,目前还需要进一步优化细胞采集的技术,提高分离效率和纯度,更深入的实验研究胎盘来源干细胞在体内、外发挥效应的分子与细胞机制,挖掘它们的治疗潜力,以便为今后临床应用打下基础。

参考文献

- [1] Gutmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time[J]. *Placenta*, 2014, 35(5):303-304.
- [2] Chien CC, Yen BL, Lee FK, et al. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(7):1759-1768.
- [3] Jarosca J, Smith T, Haynesworth S, et al. Preliminary characterization of the surface staining of placental derived adherent cells: a potential new source of stroma for umbilical cord blood (ucb) expansion[J]. *Blood*, 2000, 96(11):150b.
- [4] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5):649-658.
- [5] 吴洁莹,张毅. 胎盘间充质干细胞研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 13(3):514-517.
- [6] Kmiecik G, Spoldi V, Silini A, et al. Current view on osteogenic differentiation potential of mesenchymal stromal cells derived from placental tissues[J]. *Stem Cell Rev*, 2015, 11(4):570-585.
- [7] Yen BL, Huang HI, Chien CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1):3-9.
- [8] Karlsson H, Erkers T, Nava S, et al. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic set-

- tings in vitro[J]. *Clin Exp Immunol*,2012,167(3):543-555.
- [9] Lee JM, Jung J, Lee HJ, et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells[J]. *Int Immunopharmacol*,2012,13(2):219-224.
- [10] Chen L, He DM, Zhang Y. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro[J]. *Cell Mol Biol Lett*,2009, 14(3):528-536.
- [11] Park S, Kim E, Koh SE, et al. Dopaminergic differentiation of neural progenitors derived from placental mesenchymal stem cells in the brains of Parkinson's disease model rats and alleviation of asymmetric rotational behavior[J]. *Brain research*,2012,1466:158-166.
- [12] Liang L, Li Z, Ma T, et al. Transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells alleviates critical limb ischemia in diabetic nude rats[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(1):45-61.
- [13] Reddy S, Wasnik S, Guha A, et al. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: in vitro and preliminary in vivo studies[J]. *J Biomater Appl*,2013,27(5):565-575.
- [14] Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges[J]. *Cell Stem Cell*,2015,17(1):11-22.
- [15] Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells[J]. *Radiat Res*, 1961,14:213-222.
- [16] Dancis J, Jansen V, Gorstein F, et al. Hematopoietic cells in mouse placenta[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1968, 100(8):1110-1121.
- [17] King BF. Ultrastructural differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi[J]. *Am J Anat*,1987,178(1):30-44.
- [18] Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, et al. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi[J]. *Acta Anat (Basel)*,1989,136(3):190-203.
- [19] Dzierzak E, Robin C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells[J]. *Trends Mol Med*,2010,16(8):361-367.
- [20] Chen S, Liu S, Xu L, et al. The characteristic expression pattern of BMI-1 and SALL4 genes in placenta tissue and cord blood[J]. *Stem Cell Res Ther*,2013, 4(2):49.
- [21] Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, et al. Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity[J]. *J Exp Med*,2011,208(12):2403-2416.
- [22] Zeigler BM, Sugiyama D, Chen M, et al. The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential [J]. *Development*, 2006, 133(21):4183-4192.
- [23] Corbel C, Salaun J, Belo-Diabangouaya P, et al. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois[J]. *Dev Biol*,2007, 301(2):478-488.
- [24] Serikov V, Hounshell C, Larkin S, et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*,2009, 234(7):813-823.
- [25] 徐志国,超刘,闫铭杰. 人胎盘来源干/祖细胞生物学特性研究进展[J]. *转化医学杂志*,2013,2(6):336-340.