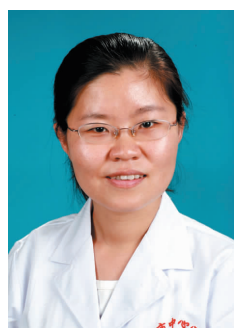


应激耐受多系分化细胞的研究进展

张坤 李芳 延冰 肖东杰 汪运山 刘华



者在 SCI 上发表文章 6 篇, EI 2 篇, 核心期刊 12 篇。

通讯作者简介: 刘华, 博士, 主管技师, 现任济南市中心医院细胞治疗转化应用研究室副主任, 济南市“千层次”创新人才。兼任山东省免疫学青年委员会会员及山东省疼痛研究会第一届细胞生物治疗专业委员会委员。2009 年毕业于山东大学医学院, 获免疫学博士学位。曾于 2007 年 8 月至 2009 年 3 月以联合培养博士生的身份留学美国肯塔基大学医学院, 2013 年 11 月至 2014 年 4 月在中国科学院广州生物医药与健康研究院进修学习。主要从事医学分子生物学与干细胞临床转化的研究, 在干细胞的诱导分化, 治疗缺血缺氧性脑病、脊髓损伤、糖尿病足及抗衰方面做了大量研究工作。近年来主持国家自然科学基金课题 1 项, 中国博士后面上项目 1 项, 山东省科技发展计划等科研课题 2 项, 济南市相关课题 3 项。作为主要作

【摘要】 应激耐受多系分化(Muse)细胞是一种具有自我更新和多向分化潜能、可向 3 个胚层分化的细胞, 并且具有非致瘤性和低端粒酶活性, 其在维持人体内稳态过程中发挥着重要作用。该文就 Muse 细胞的分离培养、生物学特性等研究进展作一介绍。

【关键词】 应激耐受多系分化细胞; 生物学特性; 临床前研究; 干细胞

Research progress on multilineage-differentiating stress enduring cells Zhang Kun, Li Fang, Yan Bing, Xiao Dongjie, Wang Yunshan, Liu Hua. Laboratory of Cell Therapy and Translational Medicine, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Shandong Research Center of Transplantation and Tissue, Jinan 250013, China

Corresponding author, Liu Hua, E-mail: liuhuagreen@126.com

【Abstract】 Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells possess self-renewal and multiple differentiation potential. Muse cells are able to differentiate into all three germ layers, and exhibit non-tumorigenicity and low telomerase activity. Muse cells play a significant role in maintaining homeostasis. This review summarizes the research progress on the isolation, culture and biological characteristics of Muse cells.

【Key words】 Multilineage-differentiating stress enduring cell; Biological characteristics; Pre-clinical research; Stem cell

应激耐受多系分化(Muse)细胞是从骨髓间充质细胞和皮肤纤维母细胞中分离出的一种新型的多能干细胞^[1]。Muse 细胞被认为是人体内唯一的能干细胞, 能够维持人体的稳态。Muse 细胞具备与胚胎干细胞及诱导性多能干细胞相似的生物学特性, 能够多向分化为 3 个胚层, 并具

有自我更新能力, 同时 Muse 细胞又具有自身的特性——低端粒酶活性和非致瘤性^[2]。Muse 细胞的特性使其在组织的再生与修复方面有着巨大的应用潜能。笔者通过以下几点进行概述。

一、Muse 细胞的分离培养及表面标志

一般情况下, 组织干细胞仅存在于干细胞所

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2018.05.001

基金项目: 国家青年科学基金项目(81200950); 山东省科技发展计划(2014GSF118173); 中国博士后科学基金面上项目(2016M590637); 山东省医药卫生科技发展计划(2016WS0139, 2016WS0134)

作者单位: 250013 济南, 山东大学附属济南市中心医院细胞治疗转化应用研究室 山东省移植与组织工程技术研究中心(张坤, 李芳, 肖东杰, 汪运山, 刘华), 胃肠外科(延冰)

通讯作者: 刘华, E-mail: liuhuagreen@126.com

属的组织中,例如,神经干细胞仅存在大脑中,造血干细胞在骨髓中。但 Muse 细胞是一类独特的干细胞,其分布在整个人体而非局限于某个特定的器官或组织中。Muse 细胞能直接从骨髓、脂肪、真皮及结缔组织中分离,也能够从培养的成纤维细胞及间充质干细胞中获得^[1,3,4]。Muse 细胞最初被认为是压力耐受细胞,将间充质或成纤维细胞在胰酶或无血清培养基中培养过夜后发现大部分细胞死亡,而剩余的存活细胞中 Muse 细胞的比例很高^[4]。目前 Muse 细胞的分离培养尚无统一的方法,一般采用最开始的胰蛋白酶长时间消化法进行分离培养,也可用磁珠分离或流式分选得到。

因在组织中比例较少,组织来源的 Muse 细胞并不是临床应用的最好来源,成纤维细胞和间充质细胞中 Muse 细胞比例相对较多。例如骨髓组织中,CD105/SSEA-3 双阳的 Muse 细胞的比例为 0.03%,而成纤维细胞和骨髓间充质细胞中 Muse 细胞的比例为 1%~6%^[1]。所以就临床应用而言,从培养的成纤维细胞或间充质细胞中分离得到 Muse 细胞更具前景。

Muse 细胞表达间充质干细胞的表面标志 CD105 以及胚胎干细胞的表面标志[特异性胚胎抗原 3(SSEA-3)]。Muse 细胞在普通培养板中呈成纤维细胞样形态,单个 Muse 细胞悬浮培养后,能形成和胚胎干细胞的拟胚体类似的细胞团,并表达多能干细胞相关标志物,如 Oct3/4、Sox2、Nanog 和碱性磷酸酶等,但不表达其他干细胞的标志物,如造血干细胞(CD34)、皮肤前体细胞(Snail)、神经前体细胞(CD271)、血管周细胞(CD146)和内皮前体细胞(CD31)等^[5]。

二、Muse 细胞的胚层分化及自我更新能力

Muse 细胞是多能干细胞,能自发分化为 3 个胚层的细胞,也可以在细胞因子的诱导下分化成为 3 个胚层的细胞^[6]。Muse 细胞自发分化的效率并不高,但在特定的诱导条件下其分化效率可增高,Wakao 等(2011 年)的一项研究显示,在肝细胞、神经细胞特定培养条件下,Muse 细胞能够有效分化。并不需要转导外源性的基因。尽管 Muse 细胞具有多能性,但其在自发分化时更趋向于分化为中胚层细胞^[1]。2013 年 Yang 等将单个 Muse 细胞悬浮培养的细胞集落转移到明胶中培养扩增,可见 3 个胚层的表面标志物均有

表达。细胞重新进行黏附培养时可见新的细胞集落生成。重复 3 次后对细胞集落进行分析依然可见 3 个胚层的表面标志物,证明 Muse 细胞能够自我更新并保持分化为 3 个胚层的能力。

三、Muse 细胞的非致瘤性和低端粒酶活性

Muse 细胞与胚胎干细胞及诱导性多能干细胞相似,均表达 Nanog、Oct3/4 和 Sox2 等多能基因。不同的是,Muse 细胞端粒末端转移酶活性较低,在体内不会形成肿瘤^[7]。将胚胎干细胞和诱导性多能干细胞接种到免疫缺陷小鼠中,8~12 周后可形成畸胎瘤,然而将 Muse 细胞移植至免疫缺陷小鼠体内,6 个月后却无形成畸胎瘤^[1]。研究证明 Muse 细胞具有较低水平的端粒酶活性,与胚胎干细胞及诱导性多能干细胞的基因表达相比,Muse 细胞的基因表达与细胞周期性进展有关,其端粒酶活性和基因表达水平与体细胞水平相当^[8]。2011 年 Wakao 等发现,与胚胎干细胞及诱导性多能干细胞相比,Muse 细胞表达的“Yamanaka 因子”低 105 倍,“Yamanaka 因子”已被证明赋予细胞多能性和致瘤性,这或许可以解释 Muse 细胞如何保持其多能性,而不会形成畸胎瘤。

四、Muse 细胞和非 Muse 细胞的不同角色

Muse 细胞和非 Muse 细胞之间存在明显的差异。首先,非 Muse 细胞不能在悬浮条件下形成 Muse 细胞样的细胞簇^[1]。非 Muse 细胞贴壁培养才能存活。其次,Muse 细胞表达多能性基因,而非 Muse 细胞并不表达,因此,非 Muse 细胞不具有多能性,不能分化为神经细胞(外胚层)、肝细胞(内胚层)甚至是同为中胚层的骨骼肌细胞等^[9]。研究证明,人类成纤维细胞来源的 Muse 细胞能够跨过中胚层和外胚层的界限,分化为有功能的黑色素细胞。而非 Muse 细胞不能分化为有功能的黑色素细胞。证明 Muse 细胞在多能性方面显著高于非 Muse 细胞^[10]。研究显示将皮肤成纤维细胞分为 Muse 细胞及非 Muse 细胞,非 Muse 细胞不能像 Muse 细胞一样被诱导为诱导性多能干细胞,因此间充质干细胞的多向分化和组织修复作用可能主要通过其中的 Muse 细胞实现^[11]。与 Muse 细胞相反,非 Muse 细胞扮演的角色是复杂而多面的。尽管非 Muse 细胞无 Muse 细胞的 3 个胚层分化能力,但其具有营养、抗炎和免疫抑制作用,可以协同 Muse 细胞发挥

组织修复作用^[12]。

五、Muse 细胞的组织修复功能

胚胎干细胞及诱导性多能干细胞应用于临床之前需要满足以下条件：①必须体外分化为目的细胞；②在移植之前必须将未分化的多能干细胞清除。需满足上述准备条件是因为胚胎干细胞及诱导性多能干细胞在体内能形成畸胎瘤，高效的分化体系也不能保证分化率达到 100%，仍会有少量的未分化细胞存在，仍存在致畸的风险。但对 Muse 细胞而言则无需上述条件，Muse 细胞具有非致瘤性和低端粒酶活性，故其在临床使用前不需要大规模的处理程序，使用较方便。同时 Muse 细胞有能力迁移并整合到受损区域，然后自发分化为与组织兼容的靶细胞，因此，Muse 细胞能在众多组织和器官中充当“修复细胞”^[13]。例如，将绿色荧光蛋白标记的 Muse 细胞静脉注射到皮肤、肌肉和肝组织受损的免疫缺陷小鼠体内，其能在小鼠体内特异性分化，在移植后 2~4 周内表现为极强大的组织再生能力，形成真皮、腓肠肌肌肉和肝脏组织^[1,14-15]。研究显示，将 Muse 细胞分化的黑色素细胞移植到小鼠受损皮肤内，黑色素细胞色素化，检测到人黑色素细胞标志物阳性，这表明 Muse 细胞可能可作为一种理想的种子细胞而用于自体移植治疗色素障碍性疾病，如白癜风等^[10,16]。最近的研究显示 Muse 细胞可被诱导为角质形成细胞、成纤维细胞及黑色素细胞，并且 Muse 细胞来源的细胞可以分化为完整的皮肤组织，Muse 细胞在皮肤再生方面有着广阔的应用前景^[17]。有研究表明在急性心肌梗死患者中，急性期 Muse 细胞数量增加较多的患者相较 Muse 细胞数量增加较少的患者，其慢性期左心室功能的改善更明显^[18]。携带有自杀基因的 Muse 细胞在治疗恶性胶质瘤中也表现出较强的安全性及迁移杀伤作用，表明 Muse 细胞在异基因细胞药物治疗方面也有应用潜力^[19]。同时 Muse 细胞能够归巢于受损的肾小球，并在系统给药后自发分化成肾小球细胞^[20]。在卒中和脑出血模型中 Muse 细胞能与宿主脑微环境整合后高比例分化为神经元细胞，并能重构神经元回路以减轻神经受损症状^[21-22]。在免疫调节方面 Muse 细胞具有抗炎活性，能减少促炎性细胞因子如 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌，Muse 细胞可以潜在用作免疫调节剂来治疗免疫相关疾

病^[23]。

六、结 语

自干细胞被发现以来，其多向分化潜能被学者们期待能用来治疗各种疾病^[24]。因伦理和致瘤性问题，胚胎干细胞及诱导性多能干细胞的临床应用受到限制。间充质干细胞虽然无致瘤的相关报道，但其在组织再生与功能修复方面仍存在很大争议。Muse 细胞能从皮肤、脂肪、骨髓中获得，也可从间充质干细胞中分离得到，有不断自我更新的能力、低端粒酶活性和非致瘤性，而且其在体内能整合到损伤部位，具有较强的组织修复能力。Muse 细胞在维持人体内在稳态过程中发挥着重要作用，下一步的研究重点在于明确 Muse 细胞维持人体内在稳态过程的机制。

总之，Muse 细胞来源广泛、取材方便、在不同的理化环境和细胞因子的诱导下具有多向分化潜能，是组织工程、细胞移植及基因治疗领域的理想靶细胞，为临床上多种疾病的治疗提供了广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (19): 8639-8643.
- [2] Fisch SC, Gimeno ML, Phan JD, Simerman AA, Dumesic DA, Perone MJ, Chazenbalk GD. Pluripotent nontumorigenic multilineage differentiating stress enduring cells (Muse cells): a seven-year retrospective. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 227.
- [3] Liu Q, Zhang RZ, Li D, Cheng S, Yang YH, Tian T, Pan XR. Muse cells, a new type of pluripotent stem cell derived from human fibroblasts. *Cell Reprogram*, 2016, 18 (2): 67-77.
- [4] Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathol Int*, 2014, 64 (1): 1-9.
- [5] Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamasaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 2013, 133 (10): 2425-2435.
- [6] Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297 (1): 98-110.
- [7] Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heideidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tis-

- sue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*, 2014, 23 (7): 717-728.
- [8] Simerman AA, Perone MJ, Gimeno ML, Dumesic DA, Chazenbalk GD. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripotent stem cells in human adult tissues. *Expert Opin Biol Ther*, 2014, 14 (7): 917-929.
- [9] Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc*, 2013, 8 (7): 1391-1415.
- [10] Yamauchi T, Yamasaki K, Tsuchiyama K, Koike S, Aiba S. The potential of muse cells for regenerative medicine of skin: procedures to reconstitute skin with muse cell-derived keratinocytes, fibroblasts, and melanocytes. *J Invest Dermatol*, 2017, 137 (12): 2639-2642.
- [11] Wakao S, Kitada M, Dezawa M. The elite and stochastic model for iPS cell generation: multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells. *Cytometry A*, 2013, 83 (1): 18-26.
- [12] Heneidi S, Simerman AA, Keller E, Singh P, Li X, Dumesic DA, Chazenbalk G. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS One*, 2013, 8 (6): e64752.
- [13] Simerman AA, Phan JD, Dumesic DA, Chazenbalk GD. Muse cells: nontumorigenic pluripotent stem cells present in adult tissues-a paradigm shift in tissue regeneration and evolution. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1463258.
- [14] Iseki M, Kushida Y, Wakao S, Akimoto T, Mizuma M, Motoi F, Asada R, Shimizu S, Unno M, Chazenbalk G, Dezawa M. Muse cells, nontumorigenic pluripotent-like stem cells, have liver regeneration capacity through specific homing and cell replacement in a mouse model of liver fibrosis. *Cell Transplant*, 2017, 26 (5): 821-840.
- [15] Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, Kuroda Y, Wakao S, Ishida K, Endo F, Kume K, Takahara T, Nitta H, Tsuda H, Dezawa M, Nishizuka SS. A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, muse cells, directly commit to the replacement of liver components. *Am J Transplant*, 2016, 16 (2): 468-483.
- [16] Yamauchi T, Yamasaki K, Tsuchiyama K, Koike S, Aiba S. A quantitative analysis of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells in human adipose tissue and efficacy of melanocytes induction. *J Dermatol Sci*, 2017, 86 (3): 198-205.
- [17] Hu MS, Longaker MT. A Muse for skin regeneration. *J Invest Dermatol*, 2017, 137 (12): 2471-2472.
- [18] Tanaka T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Nawa T, Yamada Y, Kanamori H, Mikami A, Ushikoshi H, Kawasaki M, Dezawa M, Minatoguchi S. Mobilized muse cells after acute myocardial infarction predict cardiac function and remodeling in the chronic phase. *Circ J*, 2017, 82 (2): 561-571.
- [19] Yamasaki T, Wakao S, Kawaji H, Koizumi S, Sameshima T, Dezawa M, Namba H. Genetically engineered multilineage-differentiating stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas. *Mol Ther Oncolytics*, 2017, 6: 45-56.
- [20] Uchida N, Kushida Y, Kitada M, Wakao S, Kumagai N, Kuroda Y, Kondo Y, Hirohara Y, Kure S, Chazenbalk G, Dezawa M. Beneficial effects of systemically administered human muse cells in adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28 (10): 2946-2960.
- [21] Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, Wakao S, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M. Human Muse cells reconstruct neuronal circuitry in subacute lacunar stroke model. *Stroke*, 2017, 48 (2): 428-435.
- [22] Shimamura N, Kakuta K, Wang L, Naraoka M, Uchida H, Wakao S, Dezawa M, Ohkuma H. Neuro-regeneration therapy using human Muse cells is highly effective in a mouse intracerebral hemorrhage model. *Exp Brain Res*, 2017, 235 (2): 565-572.
- [23] Gimeno ML, Fuertes F, Barcala Tabarozzi AE, Attorressi AI, Cucchiari R, Corrales L, Oliveira TC, Sogayar MC, Labriola L, Dewey RA, Perone MJ. Pluripotent nontumorigenic adipose tissue-derived muse cells have immunomodulatory capacity mediated by transforming growth factor- β 1. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6 (1): 161-173.
- [24] 蔡亮鸣, 王昭妮, 陈壮桂. 间充质干细胞对重症支气管哮喘治疗作用的研究进展. *新医学*, 2017, 48 (5): 285-292.

(收稿日期: 2018-01-20)

(本文编辑: 洪悦民)