

脐带血间充质干细胞鉴定方法相关研究进展

薛行影(综述), 肖荣驰(审校)

基金项目: 广西卫生厅重点科研课题(编号:桂卫重 2011013)

作者单位: 541001 广西, 桂林医学院附属医院骨一科

作者简介: 薛行影(1985-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脊柱关节外科疾病的诊治。E-mail: 66562475@qq.com

通讯作者: 肖荣驰(1966-), 男, 硕士研究生, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 脊柱关节外科疾病的诊治。E-mail: xrongchi@sina.com

[摘要] 脐带血间充质干细胞鉴定方法包括形态学及超微结构、细胞表面标志物、细胞因子及基因水平等四个方面, 但目前尚未形成共识, 也没有金标准。该文对有关脐带血间充质干细胞鉴定研究方面进行综述。

[关键词] 脐带血; 间充质干细胞; 鉴定

[中图分类号] R 318.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)11-1110-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.11.31

The review of the identification about umbilical cord blood mesenchymal stem cells XUE Xing-ying, XIAO Rong-chi. First Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi 541001, China

[Abstract] The identification methods of umbilical cord blood mesenchymal stem cell include morphology, ultrastructure, and cell phenotype and cytokines and gene, but there is no consensus on these methods, and there is still no golden standard. In this paper, the relevant literatures about the identification of the umbilical cord blood mesenchymal stem cell are summarized.

[Key words] Umbilical cord blood; Mesenchymal stem cell; Identification

脐带血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs)由 Erices 等^[1]于 2000 年最早报道, 它作为一种具有全能干细胞特点的细胞, 是中胚层发育的早期细胞, 具有多向分化潜能, 其形态和生物学特点与骨髓源性间充质干细胞相似。相关研究报道在不同的诱导条件下 UCB-MSCs 能够向不同的谱系分化, 不仅可分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌肉细胞和神经细胞等, 还可以跨胚层分化^[2-10], 且报道认为 UCB-MSCs 为较原始的间充质干细胞, 具有更强的增殖、分化能力, 细胞的免疫功能较弱, 引起的移植物抗宿主病较弱, 故 UCB-MSCs 可作为一种新的细胞来源, 有望替代骨髓间充质干细胞用于各系统疾病的细胞移植、基因治疗及构建组织工程种子细胞而成为研究的新热点。由于目前对于 UCB-MSCs 的鉴定方面还没有形成共识, 也没有金标准, 仍存在许多争议。本文仅就近几年关于 UCB-MSCs 的鉴定方面的进展综述如下。

1 形态学及超微结构鉴定

大多数学者认为在细胞贴壁培养的早期阶段, 通过倒置显微镜放大 100~200 倍下观察细胞的形态, 间充质干细胞呈长形及梭形, 类似成纤维细胞样, 而那些类圆形的贴壁细胞则非 UCB-MSCs 样细胞。Jang 等^[11]的研究证实在早期的培养过程中, 贴壁生长的 UCB-MSCs 中就会出现一小部分的梭形细胞, 在原代培养 7~10 d, 则出现长形、梭形的成纤维细胞样细胞, 其他报道^[12-14]也观察到类似形态的细胞。在超微结构观察方面, Montesinos 等^[13]通过对比分析骨髓、脐带血和胎盘这 3 种不同组织来源的间充质干细胞, 发现在成纤维样细胞中有几个不同的细胞形态, 例如“菱形, 板状伪足-板状伪足, 板状伪足-丝状伪足, 丝状伪足-丝状伪足以及三角形细胞”, 是否这些结构会是 UCB-MSCs 所特有的以及是否这些不同细胞形态与细胞的功能有关仍然未知。Toai 等^[15]发现当培养基中出现成骨性的诱导物时, UCB-MSCs 就开始出现形态改变。可见细胞形态及

生长特性不同可能与其生长的环境及条件等因素有关,形态学鉴定 UCB-MSCs 是一种最基本的方法,这种方法方便快捷,但是 UCB-MSCs 的细胞形态受诸多因素影响,仅靠形态学鉴定目标细胞是否具有 UCB-MSCs 表型不是一种可靠的鉴定方法,需要结合其他多种方法才能准确高效地鉴定出 UCB-MSCs。

2 细胞表面标志物鉴定

细胞表面标志物鉴定可以作为鉴定细胞的方法之一,也是目前鉴定 UCB-MSCs 的核心方法,这种鉴定方法是通过流式细胞分析技术来确定细胞表面标志物表达水平在不同目标细胞之间是否有统计学差异来鉴定间充质干细胞的,也是目前最常用的鉴定方法。普遍认为 UCB-MSCs 不表达造血细胞抗原,而表达与骨髓间充质干细胞相似的细胞表面特异性抗原。总结各种报道^[12,13,16-23]发现 UCB-MSCs 其表达的标志物有:(1)整合素家族成员 CD49b、CD49e、CD29、CD90、CD105;(2)黏附分子 CD44、CD58、CD166;(3)其他如 CD13、SH2 (CD105)、CD14、CD34、CD45、CD81、CD73、HLA-ABC、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、Stro-1、Lm、线性 poly-LacNAc、阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4)。有分析^[24-28]发现其与骨髓间充质干细胞都表达 CD13、CD73、CD105,不表达以下抗原:(1)造血细胞抗原 CD34、CD45;(2)内皮细胞抗原 CD31、CD19;(3)单核细胞抗原 CD14;(4)受体 CD62L;(5)其他如 CD80、HLA、识别有关共刺激分子 B7-1、B7-2 及主要组织相容性复合物 HLA-DR 抗原等。Sibov 等^[17]观察发现 CD90 在 UCB-MSCs 中的表达比 CD73 和 CD105 更有特异性,其进一步的定量 RT-PCR 也得出同样的结果。Montesinos 等^[13]通过对比分析骨髓、脐带血和胎盘等 3 种不同组织来源的间充质干细胞的细胞表型发现,所有的间充质干细胞都不表达造血细胞标志物 CD14、CD34 和 CD45 或者内皮细胞抗原 CD31,也不表达 CD62L,相反,它们表达粘附分子 CD29、CD44、CD49b、CD58、CD166 以及其他的一些分子(例如骨髓间充质干细胞标志物 CD13、CD73、CD105),来自这些组织的间充质干细胞都表达 HLA-ABC,但不表达 HLA-DR,研究发现在表达 CD54 方面,骨髓提取的间充质干细胞只有 23%,而在脐带血和胎盘中却有 69% 和 70%,观察还发现,在表达 c-kit 中,来自脐带血和胎盘的分别为 48%、31%,骨髓的为 19%,分析第 2 代细胞发现在骨髓间充质干细胞的 CD90 表达高达 70%,然而在脐带血中为 31%,在胎盘中为 33%;且骨髓间充质干细胞中的 CD90 的表达要比在脐带血和胎

盘中要高,这个发现与 Goodwin 等^[29]、Lee 等^[7]、Bailo 等^[30]的报道相符。Parolini 等^[5]研究发现血小板源性生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) 在脐带血、骨髓和胎盘这 3 个组织中间充质干细胞的表达也不一样,其在骨髓中为 97%,脐带血和胎盘中分别为 63% 和 70%,观察 CD54 的表达却相反,骨髓中为 23%,脐带血和胎盘中均为 70%。这意味着 CD54、CD90、c-kit、PDGFR 有望作为特异的间充质干细胞标志物来区别间充质干细胞的来源。Sun 等^[23]对脐带血干细胞和 UCB-MSCs 的免疫表型分析发现,二者在表达 Fn、CD44、Stro-1 都是阳性,CD34 是阴性,Lm、CD29 在 UCB-MSCs 中表达,而未见脐带血干细胞表达。另外,有研究^[31-34]发现脐带血干细胞的免疫活性较低,HLA-DR 在 UCB-MSCs 中比较少。Hao 等^[35]发现 HLA-II、CD80、CD86、CD40 在脐带血干细胞中也比较少,故 Lm、CD29、HLA-DR、HLA-II、CD80、CD86、CD40 这些标志物也许可以作为鉴定筛选出较纯的 UCB-MSCs。Hirvonen 等^[36]研究了 UCB-MSCs 中的线性 poly-LacNAc 的表达,发现线性 poly-LacNAc 在 UCB-MSCs 中表达,但在其他的细胞中不表达,线性 poly-LacNAc 表型将有望作为鉴别脐带血来源的间充质干细胞的一个新的标志物。自从发现 UCB-MSCs 中 mRNA 表达的 SSEA-4 合酶很丰富,Suila 等^[4]进一步研究了 UCB-MSCs 中相关的鞘糖脂表型的细胞表面物质,用抗 SSEA-3、SSEA-4、Globo-H 表型抗体通过流式细胞分析发现,间充质干细胞中 SSEA-4 是阳性的,但 SSEA-3 和 Globo-H 表型是阴性的,免疫荧光染色的非通透性细胞中发现 SSEA-4 抗体的染色是阳性的,然而 SSEA-3 和 Globo-H 抗体染色是阴性的,故认为 SSEA-4 是最好的标志物,但 SSEA-3 和 SSEA-4 的表达在不同的共培养情况下是不同的。以上可见,目前还没有一种特异性和敏感性较好且简单易行的鉴定细胞表面标志物的物质,需要进一步的研究,细胞表面标志物有助于鉴定 UCB-MSCs,但是这种鉴定方法需要排除表达 UCB-MSCs 表面标志物的其他细胞,因此该方法相对麻烦,需耗费较多的人力及物力。

3 细胞因子水平鉴定

细胞因子水平鉴定也可以作为鉴定 UCB-MSCs 的方法之一。Kluth 等^[37]研究发现来自脐带血提取的细胞中不表达鸟氨酸氨基甲酰转移酶 4A (OCT4A)、NANOG 和 SOX2。Sun 等^[23]研究认为,在脐带血中存在干细胞和间充质干细胞,且可以通过分析其所

分泌的细胞因子的特点从而区分出来,提取得到更纯的间充质干细胞,其研究发现脐带血干细胞和 UCB-MSCs 在细胞形态学、细胞增殖、细胞周期、传代、免疫表型、传统的 3 系分化能力等方面是不同的。定量 RT-PCR 分析发现粒细胞集落刺激因子 G-CSF 基因表达脐带血干细胞比 UCB-MSCs 要高,酶联免疫吸附试验发现脐带血干细胞在分泌粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、血小板生成素(TPO)、粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞巨噬细胞刺激因子要比 UCB-MSCs 高,共培养后发现,CFU-GM 在脐带血干细胞滋养层要比 UCB-MSCs 滋养层要多,流式细胞分析发现 CD14 和 CD33 的表达在脐带血干细胞要比在 UCB-MSCs 高得多,CD15 也是一样,CD15 在脐带血干细胞开始的 7 d 培养中就有表达,它的表达相对于 UCB-MSCs 来讲要早而且表达的水平也高。Hirvonen 等^[36]通过 MS 流式细胞技术和基因表达微阵列研究发现 Ig-i 在 UCB-MSCs 表达,在其他细胞中不表达,且 Ig-i 的表达取决于糖基转移酶。综上所述,目前未能找到 UCB-MSCs 的特异性细胞因子,通过上述指标综合应用可以提高 UCB-MSCs 的鉴定率。

4 基因水平鉴定

目标基因的表达水平常作为鉴定细胞的方法之一,多种目标基因的联合应用可以提高细胞鉴定结果的准确性,特别是联合多种相应目标蛋白可以使细胞鉴定结果更全面更准确。Sun 等^[23]对比分析脐带血干细胞和 UCB-MSCs 的细胞因子分泌特点,通过 RT-PCR 的定性分析发现,脐带血干细胞和 UCB-MSCs 表达 G-CSF、TPO、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、血清集落刺激因子(colony-stimulating factor, CSF)、GM-CSF mRNA,定量结果显示脐带血干细胞表达 TPO、SCF、SDF-1、GM-CSF mRNA 较少,但是对比 UCB-MSCs 来讲,其表达的 G-CSF mRNA 是比较多的,但目前鉴定 UCB-MSCs 基因方面的研究比较少,故在以上发现的阳性基因的基础上进一步研究具有特异性的阳性基因来鉴定 UCB-MSCs 是未来研究的一个方向,同时也应当联合阴性目标标记基因进一步提高 UCB-MSCs 鉴定结果的准确性。为有效地提高 UCB-MSCs 鉴定结果的准确性,还需要寻找新的目标标记基因,通过联合应用新的目标标记基因来最大程度地提高 UCB-MSCs 鉴定结果的准确性。目前没有单一特异性的 UCB-MSCs 标记基因,UCB-MSCs 在基因水平的鉴定可以依靠不同类别基因表达水平的高低来鉴定,同时尽可能减少

UCB-MSCs 鉴定结果的假阳性和假阴性,最大程度地提高其鉴定结果的准确性。同时也要考虑孕周、培养条件及培养时间等因素对 UCB-MSCs 相关基因表达水平的影响,因为不同的间充质干细胞在相同的条件下其相关基因表达水平可能不完全相同,或者同一间充质干细胞在不同的培养条件下其 UCB-MSCs 相关基因表达水平可能不完全相同。

5 结语

总之,目前 UCB-MSCs 是研究的热点,UCB-MSCs 表型的准确全面鉴定是 UCB-MSCs 的核心,为了确保提取到单一的 UCB-MSCs,要使用综合的方法来鉴定 UCB-MSCs,包括用形态学、细胞表面标志物、细胞因子、目标标记蛋白和目标标记基因来全面鉴定 UCB-MSCs,最大程度地提高 UCB-MSCs 鉴定结果的准确性,但是这样的综合鉴定方法性价比比较低,期待简单特异地鉴定 UCB-MSCs 的指标,如果成功地筛选出这种指标,UCB-MSCs 鉴定的方法才能成功地应用于临床,各种疾病的细胞治疗才能变成现实。

参考文献

- 1 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(1):235-242.
- 2 Csaki C, Matis U, Mobasheri A, et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study[J]. *Histochem Cell Biol*, 2007, 128(6): 507-520.
- 3 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.
- 4 Suila H, Pitkanen V, Hirvonen T, et al. Are globoseries glycosphingolipids SSEA-3 and -4 markers for stem cells derived from human umbilical cord blood? [J]. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3(2): 99-107.
- 5 Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 300-311.
- 6 Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8): 1105-1112.
- 7 Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1669-1675.
- 8 Bieback K, Kern S, Klütter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 625-634.
- 9 Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, et al. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with dis-

- tinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles[J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(1): 53-73.
- 10 Ali H, Bayatti N, Lindsay S, et al. Directed differentiation of umbilical cord blood stem cells into cortical GABAergic neurons[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2013, 73(2): 250-259.
- 11 Jang MW, Yun SP, Park JH, et al. Cooperation of Epac1/Rap1/Akt and PKA in prostaglandin E(2)-induced proliferation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells: involvement of c-Myc and VEGF expression[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(12): 3756-3767.
- 12 Fan X, Liu T, Liu Y, et al. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(2): 499-507.
- 13 Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(2): 163-176.
- 14 Kim JY, Kim DH, Kim JH, et al. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- β plaques[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(4): 680-691.
- 15 Toai TC, Thao HD, Thao NP, et al. In vitro culture and differentiation of osteoblasts from human umbilical cord blood[J]. *Cell Tissue Bank*, 2010, 11(3): 269-280.
- 16 Gao F, Wu DQ, Hu YH, et al. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *Transl Res*, 2008, 151(6): 293-302.
- 17 Sibov TT, Severino P, Marti LC, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation[J]. *Cytotechnology*, 2012, 64(5): 511-521.
- 18 Phuc PV, Nhung TH, Loan DT, et al. Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(1): 54-63.
- 19 Dasari VR, Velpula KK, Kaur K, et al. Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11813.
- 20 Pessina A, Bonomi A, Coccè V, et al. Assessment of human herpesvirus-6 infection in mesenchymal stromal cells ex vivo expanded for clinical use[J]. *Transpl Infect Dis*, 2009, 11(6): 491-496.
- 21 Lu X, Alshemali S, de Wynter EA, et al. Mesenchymal stem cells from CD34(-) human umbilical cord blood[J]. *Transfus Med*, 2010, 20(3): 178-184.
- 22 Jenhani F, Durand V, Ben Azoua N, et al. Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(2): 639-643.
- 23 Sun HP, Zhang X, Chen XH, et al. Human umbilical cord blood-derived stromal cells are superior to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in inducing myeloid lineage differentiation in vitro[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(9): 1429-1440.
- 24 Both SK, van der Muijsenberg AJ, van Blitterswijk CA, et al. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(1): 3-9.
- 25 Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells(MSCs) and stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 1998, 176(1): 57-66.
- 26 Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301-316.
- 27 Zhao Z, Tang X, You Y, et al. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hematopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2006, 30(8): 993-1003.
- 28 Revençu T, Trifan V, Nacu L, et al. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2013, 54(2): 291-297.
- 29 Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(11): 581-588.
- 30 Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta [J]. *Transplantation*, 2004, 78(10): 1439-1448.
- 31 Barachini S, Trombi L, Danti S, et al. Morpho-functional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for potential uses in regenerative medicine[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(2): 293-305.
- 32 Park KS, Lee YS, Kang KS, et al. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood[J]. *J Vet Sci*, 2006, 7(4): 343-348.
- 33 Oh W, Kim DS, Yang YS, et al. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Cell Immunol*, 2008, 251(2): 116-123.
- 34 Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(11): 1402-1416.
- 35 Hao L, Zhang C, Chen XH, et al. Human umbilical cord blood-derived stromal cells suppress xenogeneic immune cell response in vitro [J]. *Croat Med J*, 2009, 50(4): 351-360.
- 36 Hirvonen T, Suila H, Kotovuori A, et al. The i blood group antigen as a marker for umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(3): 455-464.
- 37 Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, et al. DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(10): 1471-1483.