

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.16.044

干细胞向雌性生殖细胞分化的研究进展*

王茜,李玉艳综述,梁志清[△]审校

(第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

[关键词] 干细胞;胚胎干细胞;成体干细胞;诱导性多能干细胞;雌性生殖细胞

[中图分类号] Q21

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)16-2274-03

近年来,医学对于女性肿瘤患者的关注已从生存时间和生存率,逐步转为如何保留患者的生育能力。其中部分患者即使通过辅助生殖技术也无法获得有功能的卵子,利用干细胞技术获得卵细胞不仅可以为这类患者解决无法生育的难题,而且可能在研究器官发生发育、濒危动物保护、基因治疗等方面起到重要作用^[1-5]。根据干细胞所处的发育阶段和分化性质不同,将干细胞分为 3 类,包括:胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs),成体干细胞(adult stem cell, ASCs),以及诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)。现将近期各种干细胞向雌性生殖细胞分化的研究进展综述如下。

1 ESCs 向雌性生殖细胞的分化

ESCs 具有发育全能性,能分化为机体的任意一种细胞类型,包括:生殖细胞^[1-2]。Hubner 等^[6]于 2003 年首次报道成功诱导鼠 ESCs 在体外分化为卵母细胞,表达生殖系的特异 RNA 和蛋白标记物。Hu 等^[7]进行 pFigla-EGFP 重组质粒的构建,并进行诱导分化,最终将一部分 GFP⁺ 细胞分化为类卵母细胞。Hayashi 等^[8]则报道利用 mESCs 先分化培养出外胚层样细胞,在更换培养基添加骨形成蛋白(BMP)4、BMP8a 等培养 3~4 d,将外胚层样细胞分化为原始生殖细胞(PG-CLCs),并将该类原始生殖细胞与 12.5 d 的雌性胚胎性腺细胞共培养,再将共培养细胞团移植至小鼠卵巢包膜下,最终发现该类原始生殖细胞分化发育为胚泡期卵母细胞。该卵母细胞周围附着类似颗粒细胞的 FOxI2⁺ 细胞。于体外促成熟后,该胚泡期卵母细胞可进一步进入减数分裂 II 期,再利用体外受精技术,最终成功产生健康、有生育功能的后代。近期, Wan 等^[9]研究发现维 A 酸和齐墩果酸均有诱导小鼠 ESCs R1/E (MESC-R1/E)向生殖细胞分化的潜能。利用 MESC-R1/E 来源形成的胚胎小体(EBs)在正常的细胞培养板生长,然后分别加入维 A 酸、齐墩果酸,72 h 后,均增加了 MESC-R1/E 向生殖细胞的分化,并且数据分析显示,维 A 酸可以诱导 MESC-R1/E 分化为雌性生殖细胞,而齐墩果酸则可以诱导 MESC-R1/E 分化为雄性和雌性两种生殖细胞。Geens 等^[10]将人 ESCs 与鼠支持细胞共培养,可以有效提高人 ESCs 分化为生殖细胞样细胞,对比他们前期实验发现同样有效促进人 ESCs 分化的 BMP4,认为一种或多种诱导因子与人 ESCs 共培养,可以有效提高 hESCs 的分化。

综上,虽然 ESCs 是雌性生殖细胞的理想来源,并且多个实验证明,ESCs 可以诱导为类卵母细胞^[6-10],甚至小鼠 ESCs 细胞经体外分化培养后已成功诞生后代小鼠^[8],但是,ESCs 诱导为卵细胞的具体机制仍然清楚,且有潜在的畸胎瘤形成风

险、免疫排斥风险及伦理争议等诸多无法逃避的问题,也注定 ESCs 在人类和动物的研究受到限制^[11]。

2 ASCs 向雌性生殖细胞的分化

ASCs 是一种具有修复和再生能力的干细胞,存在于成人的各种组织和器官当中,实验表明,在一定条件下,ASC 会进行自我更新而形成新的干细胞,或者进行分化而形成功能细胞^[3]。

2.1 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell BMSCs) BMSCs 是目前应用较广泛的一类 ASCs^[12]。Santiquet 等^[13]尝试将 BMSCs 移植到经过化疗药物处理的 PU.1 小鼠和重症综合性免疫缺陷(SCID)小鼠及胎牛卵巢,但结果显示移植 BMSCs 仅提高了 SCID 小鼠的生育率。Ghasemzadeh 等^[14]则比较了小鼠雄性和雌性来源的 BMSCs 在向生殖细胞诱导时特异标记物的表达水平,发现 Dazl 和 Rnf17 均不表达,绝大多数检验基因在二者表达水平几乎相等。而雄性来源的 BMSCs 高表达 Piwil2,很可能与其在雄性生殖细胞的分化过程扮演重要角色有关。进一步结果分析发现,雌性来源的 BMSCs 更易分化为雌性生殖细胞。虽然 BMSCs 已被证实有潜在分化为卵母细胞的潜能^[12-14],但免疫排斥和临床捐助者有限等问题限制了其临床应用^[12]。

2.2 脐带基质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell UCMSCs) UCMSCs 同样是一种具有多项分化潜能的 ASCs,且来源更加方便^[12]。自 2003 年开始,许多实验室都开始进行 UCMSCs 的分离和其多能性的检验。Ghasemzadleh 等^[14]报道利用卵泡液或卵巢提取液体外诱导 UCMSCs 形成了 EBs 及类似卵母细胞的大细胞结构,并且表达原始生殖细胞标记物;进一步通过精卵泡液(PFF)小鼠模型,发现人 UCMSCs 能够在卵巢局部存活并生长。2013 年, Qiu 等^[15]探讨了人 UCMSCs 来源于不同性别是否会影响生殖细胞的形成,分别选取培养男性胎儿来源的 UCMSCs 和女性胎儿来源的 UCMSCs,同样利用 20% 的卵泡液进行诱导。研究结果发现,二者都可以分化为类卵母细胞并且表达生殖细胞标记物,但是女性胎儿来源的 UCMSCs 生殖细胞特异标记物的表达更早,雌二醇更高,形成的类卵母细胞也更大。

2.3 其他 ASCs Dyce 等^[16]在前期发现胎儿猪皮肤来源的干细胞可以分化为类卵母细胞的基础上,进一步研究发现新生小鼠皮肤来源的干细胞有向卵母细胞分化的潜能。Xiao 等^[17]则在近期报道分离了 CD117⁺/CD44⁺ 的人羊膜液干细胞,发现该细胞不仅表达生殖细胞特异标记物,并且在 5% 的 POF 的培养基中,有接近 2% 的成体卵细胞(hAFSCs)分化成减数

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101058);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2011jjA10075)。作者简介:王茜(1990—),硕士在读,主要从事生殖医学研究工作。△ 通讯作者, Tel:13320332902; E-mail: zhi.lzliang@gmail.com。

分裂期的生殖细胞并表达卵泡生成和卵子形成相关标记物。

ESCs 卵母细胞分化不同,目前无 ASCs 分化所得卵母细胞的排卵、受精能力的报道。但临床来源方便,易于分离、培养、扩增和纯化,多次传代扩增后仍具有干细胞特性,避免了免疫排斥反应及伦理道德问题等优势,使其成为卵子的理想来源^[18]。若能进一步优化体外培养诱导方法、探明非卵巢来源干细胞体外分化及替代治疗机制,将为体外获得卵子进而为体外受精治疗提供新的希望。

3 iPSCs 向雌性生殖细胞的分化

iPSCs 是利用技术将转录因子导入体细胞内,使体细胞发生重编程从而成为多能干细胞^[4]。这些细胞有两个重要属性,自我更新能力和分化成人体的任何细胞类型的能力。可能有助于理解疾病的机制、制作新疾病模型、药物开发/药物毒性的测试,基因疗法,细胞替代疗法等。所以该细胞在临床应用和基础研究中都具有极大利用价值^[19]。

Takahashi 等^[20]于 2006 年,首次报道了体细胞来源的 iPSCs,在 2007 年,他们又通过逆转录病毒将关键多能基因: Oct3/4, Sox2, Klf4, 和 c-Myc (Yamanaka 因子) 导入成人上皮纤维母细胞而首次产生出人 iPSCs^[21]。Medrano 等^[22]则发现,利用过表达 Vasa 或 Dazl 的 iPSCs 可以分化为原始生殖细胞,并且可以通过减数分裂过程达到成熟,并认为在进化上具有无关性的和相异的 RNA 结合蛋白可以促进人类来源的生殖细胞在体外的减数分裂。2013 年, Niu 等^[23]建立了 iPSCs 系,在经过 3 d 的悬浮培养后可以自主分化为 EBs,表达 3 个胚层的特异标记物。然后,通过加入维 A 酸和 POF 培养得到的 EBs 并最终分化为类卵母细胞,因此认为由 iPSCs 分化可以分化为类卵母细胞。而近期, Medrano 等^[24]进一步发现,利用成人来源的 iPSCs,在添加猪皮凝胶的培养基中进行卵母细胞的诱导分化,14 d 后,显微镜下形态学提示,分化细胞类似卵母细胞,并且包括 Vasa, SCP3 在内的多种生殖细胞标记物呈高表达。同 ASCs 一样,虽然大量实验结果提示 iPSCs 具有向雌性生殖细胞分化的潜能^[20-24],但还未报道分化所得卵母细胞具有排卵、受精能力。此外,潜在遗传和表观遗传异常发展导致的肿瘤性,不同基因诱导的 iPSCs 的分化和发育潜能存在差异等问题^[20],提示寻求一个更有利于向生殖系发育的 iPSCs 显得尤为重要。

5 展 望

找到理想的卵子来源,是解决女性肿瘤患者不孕的关键。干细胞诱导分化为雌性生殖细胞的研究,为由于各种原因导致无法产生有功能卵子的女性患者带来了曙光。虽然,目前有实验已经证实可以由干细胞诱导分化为有功能的卵母细胞并产生后代,但还无法保证所有诱导出的类卵母细胞都具有功能,并且诱导分化过程的具体机制等也还不清楚,均需要进一步的研究证实。

参考文献

[1] Wallace WH. Oncofertility and preservation of reproductive capacity in children and young adults [J]. *Cancer*, 2011, 117(10): 2301-2310.
 [2] Woodruff TK. The oncofertility consortium-addressing fertility in young People with cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(8): 466-475.
 [3] Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, et al. Options for fertility preservation in prepubertal boys [J]. *Humanit Rep Up-*

date, 2010, 16(3): 312-328.

[4] Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, et al. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(2): 287-302.
 [5] Deutsch MA, Kaczmarek I, Huber S, et al. Sirolimus-associated infertility: Case report and literature review of possible mechanisms [J]. *Am J Transplant*, 2007, 7(10): 2414-2421.
 [6] Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells [J]. *Science*, 2003, 300(5623): 1251-1256.
 [7] Hu Y, Sun J, Wang J, et al. Characterization of female germ-like cells derived from mouse embryonic stem cells through expression of GFP under the control of Figla promoter [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(4): 1111-1121.
 [8] Hayashi K, Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(8): 1513-1524.
 [9] Wan Q, Lu H, Wu LT, et al. Retinoic acid can induce mouse embryonic stem cell R1/E to differentiate toward female germ cells while oleanolic acid can induce R1/E to differentiate toward both types of germ cells [J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(12): 1423-1429.
 [10] Geens M, Semon KD, van de Velde HA. Sertoli cell-conditioned medium induces germ cell differentiation in human embryonic stem cells [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(5): 471-480.
 [11] Lisa MS, Celso PS, Igor K, et al. The promoter of the oocyte-specific gene, Gdf9, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype [J]. *Methods*, 2008, 45(2): 172-181.
 [12] Li CX, Wang FY, Liang ZQ, et al. In vitro female germ-line potential of human umbilical cord-derived matrix stem cells [J]. *J Clin Rehabil Tissue Engineer Res*, 2010, 14(40): 7583-7587.
 [13] Santique N, Vallieres L, Pothier F, et al. Transplanted bone marrow cells do not provide new oocytes but rescue fertility in female mice following treatment with chemotherapeutic agents [J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14(2): 123-129.
 [14] Ghazemzadeh HM, Eslaminejad MB. Male and female rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells are different in terms of the expression of germ cell specific genes [J]. *Anat Sci Int*, 2014, [Epub ahead of print]
 [15] Qiu P, Bai Y, Liu C, et al. Gender depended potentiality of differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into oocyte-like cells in vitro [J]. *Cell Biochem Funct*, 2013, 31(5): 365-373.
 [16] Dyce PW, Liu J, Tayade C, et al. In vitro and in vivo germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): 1-14.
 [17] Xiao LY, Ning W, Rong Q, et al. Human amniotic fluid stem cells possess the potential to differentiate into primordial follicle oocytes in vitro [J]. *Bio Reproduct*,

2014,90(4):73,1-11.

[18] Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014,297(1):98-110.

[19] Fernandez Tde S, de Souza Fernandez C, Mencialha AL. Human Induced pluripotent stem cells from basic research to potential clinical applications in c-ancer [J]. *Biomed Res Int*, 2013,2013:430290.

[20] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006,126(4):663-676.

[21] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007,131(5):861-872.

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.16.045

[22] Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, et al. Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro [J]. *Stem Cells*, 2012,30(3):441-451.

[23] Niu Z, Hu Y, Chu Z, et al. Germ-like cell differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) cell biochemistry and function [J]. *Cell Biochem Funct*, 2013,31(1):12-19.

[24] Medrano JV, Simon C, Pera RR. Human germ cell differentiation from pluripotent embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2014,1154:563-578.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-02-10)

狄诺塞麦治疗恶性肿瘤骨转移研究进展

赵蔚, 彭亚琪 综述, 任庆兰[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 400016)

[关键词] 骨肿瘤; 狄诺塞麦; RANK/RANKL/OPG 轴

[中图分类号] R730.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)16-2276-04

骨是大部分实体肿瘤的常见转移部位,其中以乳腺癌及前列腺癌尤为常见^[1-2]。恶性肿瘤骨转移可导致严重骨相关事件(skeletal related event, SRE)发生, SRE 在病变局部表现为骨痛、病理性骨折、脊髓压缩性骨折、膀胱、直肠及生殖系统的功能障碍等, 全身性改变包括高钙血症及肾衰竭等^[2-3]。

由此可见骨转移瘤所致的 SRE 严重影响患者的生活质量、生存时间,并增加了患者的经济压力^[4],因此选择合理有效的治疗手段非常重要。恶性肿瘤骨转移的治疗方法多包括药物治疗、放射治疗、手术治疗以及分子靶向治疗,各项治疗措施疗效各异^[3],其中靶向治疗是针对疾病发生发展过程中起关键作用的某个信号转导通路,抑制或逆转疾病的发生发展,而将不良反应降至最低。近年来在这个思路的指导下各种新药层出不穷,在多种疾病的治疗上也取得了里程碑式的进展^[5-6]。本文主要探讨近年新上市的一种针对骨转移中重要信号通路细胞核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF κ B, RANK)/RANK 配体(RANK ligand, RANKL)/骨保护因子(osteoprotegerin, OPG)轴(RANK/RANKL/OPG 轴)的分子靶向药物狄诺塞麦的作用机制、目前应用于临床的疗效及前景。

1 恶性肿瘤骨转移机制

骨转移的发展过程中存在 4 个基本要素:癌细胞,成骨细胞,破骨细胞以及提供癌细胞生长的骨基质^[2]。100 多年前, Stephen Paget 提出“种子和土壤”假说,即转移性癌细胞(即种子)更倾向于在富含营养物质的骨基质(即土壤)中定植,这些营养物质包括纤维母细胞生长因子、转化生长因子 β 、胰岛素样生长因子 I 和 II、血小板源生长因子和骨形成蛋白等,当破骨细胞通过分泌蛋白酶等增进骨吸收的同时,大量生长因子也随之释放,成为癌细胞生长的沃土^[1]。

转移性癌细胞不能直接破坏骨质,其发生转移首先要激活破骨细胞分化成熟,再由破骨细胞介导骨质吸收造成肿瘤性骨质破坏才能进一步在局部继续种植生长,此时涉及一个重要的信号转导通路,即 RANK/RANKL/OPG 轴。RANK 是 RANKL 刺激破骨细胞分化和成熟的惟一靶受体,在破骨细胞膜上的表达数量也是相对稳定的;人 RANKL 属于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员, RANKL 基因编码两种形式的 II 型跨膜蛋白和一种分泌蛋白,在体内 RANKL 主要以膜结合蛋白的形式存在,主要由成骨细胞、骨髓基质细胞表达,可与破骨细胞表面 RANK 结合后促进破骨细胞前体分化成熟,此外, RANKL 还高表达于淋巴结、胸腺、肺,在脾、淋巴细胞、骨骼肌、胃及甲状腺等器官组织也可检测到表达。OPG 亦属于 TNF 受体家族成员,是一种分泌型糖蛋白,同样为 RANKL 的受体,在多数器官中 OPG 均高度表达,它通过与 RANKL 结合竞争性阻断 RANKL/RANK 的相互作用,抑制破骨细胞分化、减少骨吸收^[3-4,7]。

破骨细胞膜上的 RANK 数量较为稳定,几乎没有哪种骨诱导因子能影响它的表达^[5],因此骨组织局部微环境中 RANKL 和 OPG 表达的相对水平(即 RANKL/OPG)是决定破骨细胞形成及活性的关键,其最终决定骨的吸收和形成,若 OPG 表达水平高于 RANKL,则破骨细胞形成受抑;若 OPG 表达水平低于 RANKL,则破骨细胞形成活跃。体内许多因素均可以通过改变 OPG 及 RANKL 表达水平来调控破骨细胞活性^[8],有研究表明严重溶骨性破坏的患者 RANK/RANKL/OPG 比值比对照组明显升高,提示 OPG 表达减少或 RANKL 表达增加与溶骨性骨破坏密切相关^[9]。

因此,在恶性肿瘤骨转移时骨组织破坏的主要机制是肿瘤