

骨髓间充质干细胞与组织修复

韩亚龙 付晋凤

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞群体,根据发生的来源,干细胞可被分为两类:胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞和成体干细胞除了来源不同,其最大的区别在于增殖能力和分化潜能的不同。胚胎干细胞可无限增殖,而成体干细胞的增殖能力则有限。骨髓中除含有能分化发育成各种血细胞的造血干细胞之外,还含有产生非造血组织的间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs),其属于成体干细胞,具有干细胞的特性。由于具有易分离、扩增以及体外操作简便等特点,骨髓间充质干细胞在组织工程、细胞移植、基因治疗等领域的应用前景十分广阔。

一、骨髓间充质干细胞的特征

骨髓中除了存在造血干细胞外,还存在一种间充质干细胞(MSCs)。它是来源于胚胎发育早期中胚层的一类多能干细胞,具有以下特性:(1)自我更新能力:通过不对称分裂一方面实现增殖与分化,另一方面维持自身干细胞数量的稳定;(2)多向分化能力:具有广泛的分化潜能,既往大量实验证实在合适的分化条件下不仅可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌肉细胞等间充质细胞,而且可以跨胚层分化为外胚层的神经元神经胶质细胞和内胚层的肝细胞、内皮细胞^[1];(3)形态和生长方式:在形态上呈现为成纤维样或不规则样,胞浆丰富,核染色质细,核仁明显,平行排列或旋涡样生长。在体外具有很强增殖能力,可以在体外大量扩增和长期培养,并且可以长时间保持其未分化状态;(4)免疫表型:骨髓表达:黏附分子家族:CD₁₆₆, CD₁₀₂, CD₅₄和 CD₅₀; 整合素家族分子 CD_{49a}, CD_{49b}, CD_{49c}, CD₂₉和 CD₁₀₄; 细胞因子受体家族:白细胞介素受体、干扰素受体、肿瘤坏死因子 A; 其他:CD₁₀₅、CD₉₀和 SH₁ 不表达造血细胞表面标志,如 CD₁₄, CD₃₄, CD₄₅, CD₃等,也不表达主要组织相容性复合物分子,如 HLA-DR;(5)不同来源的具有不同的生物学性质。Peieter等^[2]的研究显示不同品系小鼠来源的骨髓具有不同的增殖能力、免疫表型和分化能力。

二、骨髓 MSCs 的分离、扩增

由于骨髓细胞的组成具有不均一性,以及 MSCs 在骨髓中含量极少只占有核细胞的 0.0001%~0.01%左右,因此分离高纯度的 MSCs 十分困难,也成为 MSCs 应用研究的关键。目前常用的分离 MSCs 的方法有 4 种:密度梯度离心法、贴壁分离筛选法、免疫磁珠分选法和流式细胞仪分离法。贴壁分离筛选法获得的细胞

作者单位:650101 云南省烧伤研究中心,昆明医学院第二附属医院烧伤科

通讯作者:付晋凤 Email: ynfj@hotmail.com

较杂,混有许多骨髓造血细胞,且不易通过换液传代去除。免疫磁珠法和流式细胞仪分离法成本昂贵,无法进行大规模的应用,而且容易使细胞失去其分化潜能。而密度梯度离心简便易行,利用 Percoll 分离液(密度在 1.073 ~ 1.082 kg/L)可获得均一性较高的 MSCs。Percoll 是包被了聚乙烯吡咯的直径为 15 ~ 30 μm 的胶体二氧化硅颗粒,在液体中颗粒大小不一,在一定离心场中可形成一定密度梯度,不同密度的细胞分布在不同的密度层内,借此可将 MSCs 与其他细胞分开,从而达到分离 MSCs 的目的。Percoll 分离液具有无毒、低渗透压、低黏度、与活细胞相容性好等特点。为了分离更均一的 MSCs, Hung 等^[3]利用一种独特的培养装置建立了一种简单、高效、经济的分离 MSCs 的方法,即利用一种具有 3 μm 小孔的塑培养皿从骨髓中筛选 MSCs,通过这种方法筛选出来的 MSCs 叫做 SS (Size sieved stem) 细胞,其均质性大于 98%, SS 细胞具有增殖和自我更新的能力,并具有向骨、脂肪、软骨组织分化的潜能。

在培养中形成成纤维集落的初始骨髓基质细胞称为骨髓成纤维祖细胞集落形成单位 (CFU-F),由骨髓 MSCs 和祖细胞组成。一般来说每个克隆都被认为是由一个 CFU-F 产生的。(0.1 × 10⁶) ~ (1.0 × 10⁷) 个骨髓有核细胞中约含有 1 个 MSCs,并且随着年龄的增加或体质的衰弱,细胞的数量逐渐减少,因此要获得足量的 MSCs,大量扩增纯化是十分必要的。对 MSCs 的细胞周期的研究表明,大约有 20% 的 MSCs 处于静止期,即 G₀ 期,这表明 MSCs 具有强大的增殖能力。并且有研究观察到人 MSCs 体外培养 12 代仍能保持正常的染色体表型和端粒酶活性。

血清一直在 MSCs 的体外生长中扮演十分重要的角色,在 MSCs 研究早期就发现筛选的合适批号的胎牛血清有助于 MSCs 的贴壁、扩增以及多系潜能的维持。同样,不同浓度的血清对培养 MSCs 纯度的影响亦较大。一般来说,10% 的胎牛血清最有利于 MSCs 的培养。浓度过高反而不利于 MSCs 的生长,因为高浓度血清中含有大量促进细胞增殖分化的因子,容易使细胞过早出现老化。最近有使用自体血清或无血清培养基培养 MSCs 的报道。

三、MSCs 的多向分化潜能

MSCs 具有多向分化潜能已经被体内外试验所验证。近 20 年来关于 MSCs 多潜能性的报道很多,这类体外研究试验均是针对不同分化方向采用了各种不同的诱导剂,分别使 MSCs 向不同的终末细胞例如成骨、成软骨、成脂肪、成肌细胞等分化。现就 MSCs 多分化潜能作以综述。

1. 向成骨细胞和软骨细胞方向分化: MSCs 移植应用于骨折修复中以促进骨折的愈合。组织工程骨要求体外支架材料上必须接种相当数量的功能细胞,一般要达到 10⁶ ~ 10⁷ 数量级,因 MSCs 易于存活且增殖周期短,故能满足此要求。同时 MSCs 分泌表达 I 型胶原,在特定的条件下,可向成骨细胞分化。有实验表明,新鲜骨髓细胞或者纯化培养后的 MSCs 复合羟多孔基磷灰石陶瓷后具有成骨能力。组织化学检测显示连续的反应开始于成骨细胞在 HA 孔壁的黏附以及骨基

质的分泌。新骨形成后紧密连接于 HA 的孔隙表面,更为重要的是,这种新骨植入骨缺损部位具有促进愈合的能力。祝建中等^[4]将分离兔骨髓 MSCs 与纳米羟基磷灰石胶原材料联合体外培养,建立兔桡骨节段性缺损模型,通过复合材料移植术,发现其有强的成骨性,可以作为一种较好的工程种子。Kadiyala 等^[5]将大鼠的 MSCs 吸附于 HA/TCP 圆柱体,填充大鼠股骨缺损,MSCs 成骨分化较对照组快。其实验结果表明:MSCs 可在体外大量增殖,由于取材方便,自体应用时无免疫排斥性,是一种良好的骨修复功能细胞。

Angel 等^[6]将 MSCs 以醋化的透明质酸为支架,经 TGF- β 1 等诱导后分化为软骨细胞。Ponticelli 等^[7]将人 MSCs 以 TGF- β 1 等诱导后产生富含 S-GAGs 型胶原的软骨样的细胞外基质。

2 向心肌细胞样方向分化:MSCs 移植治疗心脏疾病在于补充丧失的心肌细胞。张蕾等^[8]采用模仿心肌样分化的微环境因素,促使 MSCs 向心肌细胞分化。结果发现源于心肌细胞的可溶性因素可使 MSCs 向心肌细胞方向分化,证据是心肌细胞特异性蛋白质表达显著增加,包括发育过程中最早形成的特异性结构蛋白 titin172 以及心室肌细胞缝隙连结对特异性组成蛋白 CX43。Wang 等^[9]将 DAPI 标记后的成年小鼠的 MSCs,注入另一小鼠的心肌中,4~12 周后,供者 MSCs 向心肌细胞分化。

3 向神经细胞方向分化:神经系统损伤的治疗在临床上一直是个棘手的问题,尤其是中枢神经系统损伤。早在 1999 年 Kopen 等^[9]用免疫磁珠法分选 CD11b 的小鼠 MSCs,双苯甲亚胺和 BrdU 标记后注入新生小鼠侧脑室。MSCs 迁徙经过前脑、小脑。在纹状体、海马中分化为成熟的神经胶质细胞。在脑干的网状结构中出现表达神经丝的供体细胞,提示 MSCs 可以分化为神经元。许予明等^[10]采用二甲亚砜对大鼠 MSCs 进行体外诱导扩增,发现其在体外可形成神经元样细胞和胶质样的细胞。MSCs 如用于神经系统疾病的治疗比其他干细胞具有更显著的优点:取材方便、易在体外分离培养和扩增,自体 MSCs 移植又避免了移植后的免疫排斥反应,这些均有利于进行中枢神经系统疾病或损伤修复的细胞治疗。且 MSCs 易于外源基因的转染和表达,通过转基因方法可将利于其定向分化的外源基因导入 MSCs,以加速其在体内的分化而促进组织修复。然而 MSC 在体内和体外向神经细胞分化的机制究竟是什么,是何物质或基因启动和决定了这种跨胚层分化,其分化的具体机制还不十分清楚,还有待于进一步研究。

4 向表皮细胞及皮肤附属器细胞方向分化:大面积烧伤后皮源不足是临床医师治疗烧伤棘手问题,MSCs 体外诱导其向表皮细胞分化为皮肤组织工程种子细胞提供了一个新的方向。邹丽琴等^[11]采用大鼠体外分离培养 MSCs,并采用直接贴壁法,使用表皮细胞生长因子诱导下,随着培养天数增加,逐渐出现细胞角蛋白阳性比例增加。结果说明,在体外培养的诱导下,MSCs 具有分化为表皮细胞的倾向。呼和塔娜等^[12]采用体外培养的 MSCs 悬液移植给皮肤深度烧的受体鼠创面,观察创面愈合速度,发现骨髓 MSCs 对皮肤深度烧伤具有明显的疗效。据文

献^[13]报道,将体外培养的骨髓间充质干细胞直接加入皮肤创伤部位,可发现在创伤微环境下能加速愈合,具有向表皮细胞分化的趋势。大面积烧伤伤及皮肤全层及附件时,仅靠创面自身难以实现皮肤的再生,需要足够的皮肤替代物进行修复、而具有可自体取材、体外培养扩增、避免排斥反应等优势,使其在皮肤的组织工程学上具有潜在的应用价值。

李海红等^[14]采用 Wistar大鼠 MSCs密度梯度离心分离、纯化 MSCs,体外培养扩增后,用 BrdU 标记细胞,建立全厚皮肤缺损创面模型,将 BrdU 标记的 1×10^6 ml MSCs 从静脉输注,术后取创面组织,行 BrdU 免疫组织化学单染色,以及 BrdU 和广谱角蛋白免疫组织化学双染色。结果发现 BrdU 阳性细胞出现在创面皮下组织、皮脂腺、毛囊和骨髓腔中。但在实验中也观察到, BrdU 标记的 MSCs 出现在创面皮下组织、皮脂腺及毛囊。免疫组织化学双染色结果显示皮脂腺和毛囊 BrdU 染色阳性的细胞同时表达广谱角蛋白,提示创面愈合过程中 MSCs 可以向上皮细胞转化;但大部分广谱角蛋白阳性的毛囊、皮脂腺细胞并不表达 BrdU,提示这些细胞来源于创面残留或创缘的细胞,而非外源性 MSCs 转化的细胞;皮下组织中 BrdU 阳性的 MSCs 并不表达角蛋白。说明在损伤条件下,微环境中所含的各种因子促进 MSCs 向该环境所需要的细胞或组织分化, MSCs 这种能够获得新表型的特性,使其在许多器官系统疾病中有广泛应用^[15]。

5. 向肌腱及脂肪细胞方向分化: Young 等^[16]将自体 MSCs 吸附于胶原凝胶后种植在兔跟腱上断口损伤的接缝上,发现用 MSCs 处理的肌膜较对照组好。岑航辉等^[17]通过人体分离,体外诱导培养间充质干细胞,发现其可向脂肪细胞表型转化。

四、MSCs 的临床应用及前景

1. MSCs 具有取材方便,在体外培养能保持其多向分化潜能,遗传背景稳定,植入体内无免疫排斥反应,易于临床应用等特点,是组织工程中理想的种子细胞。因此在组织工程中作为种子细胞,经培养扩增后,与不同的生物材料结合,修复骨、软骨、肌腱等组织缺损。

2. 细胞移植治疗上,有序地输注转基因 MSCs,促进造血功能恢复,或者定向诱导分化为心肌细胞、神经细胞等进行细胞移植治疗。

3. MSCs 通过严格的细胞间接触、诱导造血干细胞表达归巢受体、产生生长因子支持造血。基因治疗上,将外源性基因转入 MSCs,使之有效并持久地表达,治疗缺乏循环蛋白导致的疾病,如血友病 B。

五、存在的问题与展望

虽然骨髓 MSCs 具有广阔的应用前景,但是还有许多争论性的问题没有解决:(1)到目前为止仍没有十分完善地获得和培养扩增 MSCs 的方案,尚未能建立鉴定 MSCs 的统一标准,仍未能筛选到 MSCs 特异性的标记分子,因此不同实验室的数据之间的可比性差;(2)分化的 MSCs 是否具有功能,是否有足够的数量和潜能,是否有致瘤性的危险等等,所以应用成体干细胞治疗疾病和胚胎干细胞一样

存在种种困难; (3)是何种信号诱导了骨髓 MSCs 向多系分化,其诱导分化的分子机制尚不明确。此外,揭示干细胞发育的分子机制的研究,干细胞移植的免疫问题,影响干细胞移植成功的因素如:干细胞的来源,干细胞的发育状态,自然凋亡过程,宿主提供的微环境,都是有待深入研究解决的问题。

尽管如此,由于 MSCs 具有多组织分化潜能和高增殖特性,容易获取,便于自体移植等特点,因此我们深信 MSCs 在组织工程、基因工程以及临床应用上有着光明的前景。

参 考 文 献

- 1 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al Pluripotency of mesenchymal stem cells cell derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
- 2 Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential [J]. *Blood*, 2004, 103 (5): 1662-1668.
- 3 Shih-Chieh H, Nien-jung C, Shie-Liang, et al Isolation and characterization of size sieved stem cells from human bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 249-258.
- 4 祝建中, 苗宗宁, 钱寒光, 等. 骨髓间充质干细胞成骨性能的实验研究 [J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2005, 25 (5): 783-786.
- 5 Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP, et al Culture expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defects [J]. *Tissue Eng*, 1997, 3: 173-178.
- 6 Angele P, Kajat R, Nerlich M, et al Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge [J]. *Tissue Eng*, 1999, 5 (6): 545-554.
- 7 Ponticelli MS, Schinagl RM, Kadiyala S, et al Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 52 (2): 246-255.
- 8 张蕾, 陈沅, 田杰, 等. 骨髓间充质干细胞心肌样分化的微环境因素 [J]. *临床心血管病杂志*, 2006, 22 (11): 686-688.
- 9 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10711-10716.
- 10 许予明, 秦洁, 邢莹, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2004, 39 (2): 269-271.
- 11 邹丽琴, 苏跃勇, 孙荣距, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化的初步研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28 (6): 584-586.
- 12 呼和塔娜, 郭丽, 凌翎, 等. 骨髓间充质干细胞移植对豚鼠皮肤深度烧伤的治疗作用 [J]. *中国康复理论与实践*, 2005, 11 (1): 13-15.
- 13 呼和塔娜, 郭丽, 陈强, 等. 骨髓间充质干细胞治疗皮肤深度烧伤的实验研究 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2005, 31 (3): 334-336.
- 14 李海红, 付小兵, 王君, 等. 骨髓间充质干细胞分化为皮肤附属器细胞的初步研究 [J]. *中华修复重建外科杂志*, 2006, 20 (6): 675-678.
- 15 Kajstura J, Rota M, Whang B, et al Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (1): 127-137.
- 16 Young RG, Bulter DL, Weber W, et al Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair [J]. *Orthop Res*, 1998, 16: 406-413.
- 17 岑航辉, 韩春贤, 赖平平, 等. 成人骨髓间充质干细胞的体外诱导培养及向脂肪细胞的定向分化 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2003, 32 (2): 137-140.

(收稿日期: 2007-10-26)

(本文编辑: 安静)

韩亚龙, 付晋凤. 骨髓间充质干细胞与组织修复. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2008, 3 (1): 98-102