doi:10.11659/jjssx.03E016030

·综 述·

脂肪间充质干细胞向成骨细胞分化的研究进展

赵 宇[1],杨 民[2] (1.皖南医学院研究生院外科学骨科,安徽 芜湖 241001;2.皖南医学院附属弋矶山医院创伤骨科,安徽 芜湖 241001)

Research progress on differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells into osteoblasts

ZHAO Yu[1], YANG Min[2] (1. Depatment of Orthopaedics, Graduate School of Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001, China; 2. Depatment of Orthopaedics, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001, China)

[摘 要] 脂肪间充质干细胞因其具有良好的成骨分化潜能,且较骨髓间充质干细胞有提取技术简单、来源广泛等优点。然而随着应用增多,其存在的问题日益突出,如最佳成骨分化浓度、分离纯化、致瘤性及安全性等问题还有待进一步解决。脂肪间充质干细胞的应用与研究逐渐受到重视,但同时存在诸多问题。本文就脂肪间充质干细胞的分离培养、生物学特性和临床应用进行综述。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;成骨细胞;诱导分化;骨组织工程

[中图分类号] R331.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-03-12

间充质干细胞来源于人体发育早期的中胚层以及外胚层,是干细胞家族众多成员中的重要一员,它最早在骨髓中被发现,是一群多能干细胞,具有多向分化能力。近年来,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)成骨能力逐步被发掘[1],已成为公认的骨种子细胞来源[2]。但是,由于骨髓间充质干细胞提取不易、骨髓提取量有限、提取数目很低、干细胞随着年龄增长而降低等多种原因[3],致使其应用经常受限。而相对骨髓间充质干细胞,脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells,ADSCs)提取过程中对供体损伤小,而且可以抽脂术中丢弃的脂肪组织悬浮液为重要来源,因此对脂肪间充质干细胞的研究已成为热点。近年来通过研究发现,间充质干细胞可以通过脂肪分离大量获得[4],且可向成骨细胞、成软骨细胞、肌肉细胞、心肌细胞、脂肪细胞等定向诱导转化[5-9],可在组织工程领域研究中作为多种组织工程的种子细胞广泛应用[10]。

1 ADSCs 的分离培养

与 BMSCs 相比较,在分离培养方面上 ADSCs 有着很大的优势:①取材简单方便。ADSCs 广泛存在于人体中不同部位的脂肪组织中[11],储量丰富且取材无痛苦,目前的吸脂术一次可提取约 200 mL 脂肪,可分离出大约1×10^6的干细胞,为骨髓分离的40倍。②分离简单。提取的脂肪剪碎后经Ⅰ型胶原酶消化,再经过简单梯度离心后即可获得。③培养简单。ADSCs 具有很强的体外扩增能力,原代细胞在接种密度为 3 500/cm^2 的情况下 5~7 d 就可生长汇合。细胞增殖速度在 10~20 次传代后并无明显减慢,衰老细胞在细胞传代 6 次后出现,衰老细胞在第 15 代细胞中约占 15%[12],一般认为第三代的 ADSCs 的增殖活性最高。

2 ADSCs 有关成骨能力的生物学特性

2.1 免疫表型

在免疫表型方面,ADSCs 与 BMSCs 极为相似,它们都表达 STRO-1、CD105 和 CD166,这 3 种特异表达物在细胞多向分化能力中最常见到,此外还表达 CD117。ADSCs 还表达其他许多表面分子标志[13],包括 CD29、CD90 等。其中 CD29 对血管发育起着重要作用,CD90 对 T 细胞活化、识别和粘附密切相关。ADSCs 不表达如 CD11b、CD45、CD49d、CD106 以及 CD3、CD11c、CD14、CD38、CD144 等内皮细胞和造血系统中的一些表面标志物[14-15]。ADSCs 中表达 IILA-DR 蛋白和 MHC-Ⅱ类分子、CD40、CD40L、B7-1、B7-2 的极少,这表示 ADSCs 具有同种异体移植的潜能[16]。ADSCs 表达 VLA-4,不表达 VLA-4 的同源受体 VCAM-1;BMSCs 的表达情况却与 ADSCs 相反(VLA-4:CD49d/CD29,VCAM-1)[17-18]。

2.2 ADSCs 向成骨细胞的分化

ADSCs 有着良好的多向分化能力,可以向诸如成骨细胞、成软骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞等经典的间

[基金项目] 国家自然科学基金(81341054,81171732)

[通信作者] 杨 民,E-mail:pkuyang@hotmail.com

充质细胞分化,亦可向非间充质细胞系分化。在一定的培养条件下,ADSCs 可以被诱导分化成为成骨细胞。ADSCs 具有一定的体外成骨分化能力。有研究表明相较于高糖的 DMEM-F12 培养基或 DMEM 培养基,低糖培养基更能促进 ADSCs 的成骨分化。ADSCs 在含有 100 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-磷酸甘油、0.05 mmol/L 维生素 C 的无糖常规培养基中诱导培养,7 d 后进行碱性磷酸酶染色镜下可见多数细胞浅蓝色着色,28 d 后进行茜素红染色镜下可见广泛散在的红色钙化灶结节[19]。ADSCs 在向成骨细胞诱导分化后可以表达成骨细胞众多表达基因,诸如骨桥蛋白、碱性磷酸酶、成骨素、骨结合素、骨唾液蛋白、BMP 受体Ⅰ和Ⅱ、BMP-2、BMP-4、PTⅡ-受体和 RunX-1[20]。ADSCs 在成骨诱导分化后的骨桥蛋白、碱性磷酸酶的表达量明显提高[19]。骨桥蛋白(osteopontin,OPN)是分泌型钙结合磷酸化糖蛋白中的一种,广泛存在于多种组织以及细胞中,它能与骨组织中的羟磷灰石紧密的结合,在骨钙的细胞-基质作用、沉积、钙化中发挥关键作用[21]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性越高,则说明前成骨细胞分化为成熟成骨细胞程度越高。它作为成骨细胞分化早期的重要标志酶之一,可破坏生物体内的钙化抑制剂,启动钙化过程,所以是成骨分化开始的标志[22]。成骨诱导后的 ADSCs 通过 PT-PCR 检测骨桥蛋白以及碱性磷酸酶的活性,可发现骨桥蛋白的含量随着诱导时间的延长而越来越高,在 21 ~ 28 d 时,表达到最高峰;而碱性磷酸酶在 7 ~ 14 d 时表达到最高峰,但之后其表达量明显下降。茜素红染色也证明了有广泛散在的钙化结节在诱导分化的第 28 d 形成,这些与柳向东等[23]对 BMSCs 的成骨诱导分化结果基本一致。

此外,通过使用聚酰亚胺和聚氨酯等生物材料做为支架,将人 ADSCs 种植于免疫缺陷大鼠异位骨,8 ~ 12 周后即可再生头盖骨,对这些种植物进行组织学分析表明,来源于人的 ADSCs 形成了新的骨组织。说明了 ADSCs 在成骨分化方面一定程度上可以取代 BMSCs,是一种合格的骨种子细胞。

3 ADSCs 在组织工程技术中的应用

通过组织工程技术修复和替代缺损的组织器官具有重要的实用价值,而组织工程的基础是种子细胞。目前能够作为种子细胞的包括成体干细胞(如 BMSCs、ADSCs)、前体细胞、胚胎干细胞。虽然在理论上胚胎干细胞是最佳的种子细胞,但由于伦理、安全、法律等诸多因素的影响,削弱了胚胎干细胞的优势。由于含量低、衰老快等原因前体细胞也很难成为种子细胞的最佳选择。BMSCs 不仅细胞数量和分化能力都随着培养代数增加而下降,而且其最大的问题是提取痛苦、提取不便及提取数量少。相比之下,ADSCs 因为种种前文已提及的优势有望成为理想的组织工程种子细胞来源。

4 ADSCs 目前研究存在的问题

虽然对 ADSCs 如火如荼的研究使得 ADSCs 成为干细胞研究中的新热点,且 ADSCs 的研究已取得了一定的进展,但依然存在一些问题,关于 ADSCs 的相关研究仍然任重道远。主要存在以下问题:①ADSCs 虽然可以在诱导分化下具有成骨能力,但其具体机制尚不清楚。且近年来对于 ADSCs 的成骨分化能力的研究多为体外试验,对于在体内微环境,尤其是在病理状态下的体内微环境与 ADSCs 的相互作用机制,以及 ADSCs 在体内如何被调控定向分化,如何建立合适的动物模型等,目前的研究很少,但这正是对于理解 ADSCs 作用机制和将 ADSCs 的成骨临床应用的关键之处。②来源于不同个体、不同部位 ADSCs 的分化能力各不相同,有的还有明显的差别[24],其具体原因并不清楚。但这同样为关于 ADSCs 的最佳供体、供给部位提供了新的研究方向。③ADSCs 移植入体内需要有合适的生物材料作为支架。目前实验表明,在 ADSCs 在聚酰亚胺和聚氨酯两种支架材料上有着很高的覆盖率,但在硅酮弹性材料上则效果不佳。对支架材料的选用有待进行进一步的研究。

5 ADSCs 研究的展望

ADSCs 来源广泛,在人体内含量丰富,提取简单方便,体外扩增能力强且培养难度低[25-26],较 BMSCs 在成骨方面有着更良好的临床应用前景。随着对 ADSCs 分子机制和更多特性的深入研究,ADSCs 有望成为临床和研究上优秀的种子细胞,在临床应用和组织工程的研究中具有良好的潜力。

[参考文献]

[1] Zou J,Yuan C,Wu C,et al. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymalstem cells[J]. Connect Tissue Res,2014,55(4):304 - 309. doi:10.3109/03008207.2014.930140.

[2] Yuan J,Cui L,Zhang WJ,et al. Repair of canine mandibular bone defets

with marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate[J]. Biomaterials,2007,28(6):1005 - 1013.

[3] 王宇玫,张 浩,李 君,等.不同年龄人群骨髓间充质干细胞的生长变化[J].中华老年多器官疾病杂志,2008,7(3):223 - 226.

[4] Tapp H,Hanley Jr. EN,Patt JC,et al. Adipose-derived stem cells:characterization and current application in orthopaedic tissue repair[J]. Exp Biol Med(Maywood),2009,234(1):1 - 9. doi:10.3181/0805 - MR - 170.

[5] Mahmoudifar N,Doran PM. Osteogenic differentiation and osteochondral tissue engineering using human adipose-derived stem cells[J]. Biotechnol Prog,2013,29(1):176 - 185. doi:10.1002/btpr.1663.

[6] Zaminy A,Ragerdi Kashani I,Barbarestani M,et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells:melatonin as a differentiation factor[J]. Iran Biomed J,2008,12(3):133 - 141.

[7] Hamid AA,Idrus RB,Saim AB,et al. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation[J]. Clinics (Sao Paulo),2012,67(2):99 - 106.

[8] Palpant NJ,Metzger JM. Aesthetic cardiology:adipose-derived stem cells for myocardial repair[J]. Curr Stem Cell Res Ther,2010,5(2):145 - 152.

[9] Moioli EK,Chen M,Yang R,et al. Hybrid adipogenic implants from adipose stem cells for soft tissue reconstruction in vivo[J]. Tissue Eng Part A,2010,16(11):3299 - 3307. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0157.

[10] 张 钦,马真胜,刘 建,等.成骨诱导自体脂肪源性干细胞用于修复兔颅骨缺损[J].中国骨肿瘤骨病,2009,8(2):104 - 107.

[11] 张 勇.脂肪干细胞的研究进展[J].医学研究生学报,2009,22(10):1088 - 1092.

[12] Zuk PA,Zhu M,Mizuno H,et al. Multilineage cells from human adipose tissue:implications for cell-basedtherapies[J]. Tissue Eng,2001,7(2):211 - 228.

[13] 谢泽飞.不同年龄段、不同取材部位大鼠脂肪间充质干细胞生物学特性的对比研究[D].广东:汕头大学,2013.

[14] Li DF,Yang C,Li Z,et al. Immunophenotype determination of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells at passage 4[J]. J Clin Rehab Tiss Eng Res,2010,14(23):4207 - 4210.

[15] Rodriguez AM,Pisani D,Dechesne CA,et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse[J]. J Exp Med,2005,201(9):1397 - 1405.

[16] 韩 铮.脂肪来源干细胞免疫原性和免疫调节作用的实验研究[D].广州:南方医科大学,2009.

[17] Lei YH,Fu XB,Sheng ZY,et al. Cellular phenotype transdifferentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells[J]. Chin J Surg,2010,48(14):1106 - 1109.

[18] 房 艳. ADSCs 移植治疗 STZ 诱导的 SD 大鼠Ⅰ型糖尿病肾病的研究[D].沈阳:中国医科大学,2012.

[19] Guo YP,Tao CB,Zhang AJ,et al. Osteogenic induction of human adipose-derived stem cells[J]. J Clin Rehabilitative Tissue Engineering Research,2014(19):2987 - 2992.

[20] Zuk PA,Zhu M,Ashjian P,et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell,2002,13(12):4279 - 4295.

[21] McKee MD,Pedraza CE,Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone[J]. Cells Tissues Organs,2011,194(2 - 4):313 - 319. doi:10.1159/000324244.

[22] Datta P,Ghosh P,Ghosh K,et al. In vitro ALP and osteocalcin gene expression analysis and in vivo biocompatibility of N-methylene phosphonic chitosan nanofibers for bone regeneration[J]. J Biomed Nanotechnol,2013,9(5):870 - 879.

[23] 柳向东,唐朝晖,白祥军,等.人骨髓间充质干细胞定向成骨诱导中碱性磷酸酶对其成骨能力的影响[J].中华创伤杂志,2009,25(10):945 - 948.

[24] Strong AL,Strong TA,Rhodes LV,et al. Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways[J]. Breast Cancer Res,2013,15(5):R102.

[25] Arthur A,Zannettino A,Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair[J]. J Cell Physiol,2009,218(2):237 - 245. doi:10.1002/jcp.21592.

[26] Jurgens WJ,Oedayrajsingh-Varma MJ,Helder MN,et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue:implications for cell-based therapies[J]. Cell Tissue Res,2008,332(3):415 - 426. doi:10.1007/s00441 - 007 - 0555 - 7.

(编辑:周小林)