DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.036

综述

文章编号:1000-5404(2003)02-0176-03

间充质干细胞在组织工程中的研究进展

Improvement of MSCs for tissue engineering

罗 飞 综述,许建中 审校 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

种子细胞一直是组织工程研究的核心问题之一,理想的种子细胞应该具有容易获得、容易体外培养增殖、长期传代不改变生物学特征、抗原性小、组织修复能力强等特性。近年来,发现骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)基本具备上述条件,成为骨、软骨等组织工程中非常有应用前景的种子细胞,现将其最新研究进展综述如下。

1 MSCs的生物学特性

上个世纪70年代中期发现在骨髓标本中有小部分贴壁生长的细胞在培养过程中能够分化形成类似骨或软骨的集落,后来证明这种细胞可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞等多种类型的细胞。这种具有干细胞特性、能够向多种中胚层组织分化的细胞被叫做MSCs。近年来,随着对这种细胞研究的深入,发现它有许多优秀的生物学特性:只需在局麻下穿刺抽取骨髓就可以获得自体MSCs,取材方便、机体损伤小、易于临床操作;在体外培养中具有贴壁生长的特性,易于分离纯化;体外培养可以多次传代并保持分化能力,易于扩增数量;来于自体,无须配型,无抗原性;具有干细胞的多向分化能力,可以分化成骨、软骨、肌肉、肌腱和脂肪等中胚层组织,适用于多种组织的修复重建;更新率低而代谢活力高,容易通过转基因技术获得目标基因并在体内外长期表达[1~3]。因此,MSCs可以作为骨、软骨、腱等组织工程较理想的种子细胞来源;也可以作为基因治疗中接受目标基因的优秀载体细胞;有人证实MSCs在体外培养时能分泌粒细胞集落刺激因子等造血系细胞因子[4],看来MSCs还可以用于造血系统疾病的细胞治疗;还有人尝试把MSCs用于动物脊髓损伤[5]和脑卒中[6]的治疗获得明显效果。这些特性使MSCs在未来的医学领域中具有不可限量的应用前景。

2 MSCs的分离纯化

MSCs分布广泛,胚胎时期存在于各种组织中,参与骨、软骨等组织的形成;成年后主要集中存在于骨髓中,骨膜、骨骼肌等组织也少量存在,在组织损伤修复的生理过程中有重要作用。即使在MSCs最集中的骨髓,其比例也非常小。Kadiyala[7]通过密度梯度离心筛选,认为狗骨髓中每2.5×10^4个有核细胞中仅存在1个MSCs,在培养皿中呈单层排列的纺锤体样(成纤维细胞样外观),体外培养时始终保持20%左右的细胞处于静止期,平均倍增时间是2 d,向成骨系方向发展可以被地塞米松所诱导。Zohar等[8]利用流式细胞仪分离马MSCs,认为未分化的MSCs具有体积小、核浆比大,不表达Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原、碱性磷酸酶、骨桥接素等特征。除密度梯度离心和流式细胞仪之外,还可以利用MSCs在体外培养中贴壁生长的特性将其从造血系细胞中分离出来,因为此法简单有效成为目前分离MSCs最常用的方法[1~3]。

但上述3种方法都不能得到纯化的MSCs,其中混有一定的单核/巨噬系细胞、内皮细胞等,而对其研究和应用都需要纯化的MSCs,因此不少学者企图获得MSCs的特征性表面标记来筛选和鉴定MSCs。Pittenger等[1]观察了MSCs表面蛋白表达SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124,不表达造血系特征性标志CD14、CD34、CD45,证明了MSCs与造血谱系不是一类细胞。Conget等[9]利用流式细胞仪研究了人MSCs可能存在的多种表面抗原,发现对相应的抗体呈阴性的有CD1a、CD14、CD31、CD34、CD45、CD56和ESA。Cooper[10]用深低温储藏的MSCs在鼠移植模型中用反转录PCR方法观察人骨唾液蛋白(Bone sialo protein,BSP)和骨钙素(Osteocalcin)的表达,提示未分化细胞不表达BSP和骨钙素,但植入后3周可在部分标本检测出BSP的RNA表达,6周后从组织学上见到骨的形成并且每个标本均检测到BSP的cDNA,提示MSCs表面标志的表达在不同的分化过程中可能会有所不同。虽然经过大量努力,目前仍然无法分离出特异的细胞表面标志,从表面标志纯化、鉴定MSCs的方法还有待进一步研究。也有学者用单细胞克隆的方法获得纯的MSCs细胞株[11],即使这样得到的也是不同分化时期的MSCs,而且这种方法不便大量获得细胞。总之,目前尚无确切可行的方法来获得纯化的MSCs,培养贴壁法以其操作简单、成本低廉、对细胞损伤小的优势成为分离MSCs的主要方法。

3 MSCs的定向诱导分化

MSCs具有多向分化特征,具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控的,在培养基中加入一定的诱导剂可以诱导MSCs向一定方向分化。近年来国内外对诱导剂进行了大量的研究,普遍认为糖皮质激素、维生素C、β-甘油磷酸钠[11]、维生素D[11]、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)[12]、转化生长因子-β(Transforming growth factor-β,TGF-β)[13]及骨形态形成性蛋白(Bone morphogenic protein,BMP)[12]等能诱导

作者简介:罗 飞(1976-),男,四川省内江市人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织修复材料方面的研究。电话:(023)68754164

收稿日期:2002-03-01;修回日期:2002-08-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成骨分化。TGF-β[1,13,14]、胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)-I[14]及整合素等能诱导 MSCs 向软骨方向分化, 地塞米松、胰岛素、消炎痛[1]等能诱导成脂肪分化, 成肌及成肌腱分化诱导剂有少量报道, 但其研究工作很不成熟。这些诱导剂发挥作用的机制、诱导剂间的相互作用、最佳效量比和序贯应用的方法等问题目前尚无明确答案, 最新的研究开始了这些方面的探索。

Kveiborg 等[11]利用反转录 PCR 和 RNA 印迹技术检测用 1, 25-2 羟维生素 D3 处理的 MSCs 中胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)mRNA 含量, 结果 IGFs-Ⅰ、Ⅱ的 mRNA 量与 1, 25-2 羟维生素 D3 无剂量相关性; 而 1, 25-2 羟维生素 D3 处理可以增加胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs)-2、3、4 稳态 mRNA 的量, 但与 IGFBPs-5、6 无关。认为 1, 25-2 羟维生素 D3 所具有的抑制增殖、促进分化的作用, 其机制可能与 IGFBPs 2、3、4 的表达有关。

Worster 等[13]进行了不同浓度 TGF-β1 对马 MSCs 的体外培养中细胞增殖能力和Ⅰ、Ⅱ型胶原表达强度影响的量化研究, 认为在 5 ng/ml TGF-β1 浓度作用下Ⅰ、Ⅱ型胶原 mRNA 的量分别是对照组的 2 8 和 1 7 倍, 1 ng/ml 组和 10 ng/ml 组均不及 5 ng/ml 组明显, 说明 TGF-β1 促进 MSCs 向骨和软骨方向分化的作用具有剂量依赖性, 5 ng/ml 是最适剂量。Worster 等[14]进一步研究了马 MSCs 复合三维纤维蛋白支架分别序贯应用含 5 ng/ml 的 TGF-β1 和 100 ng/ml 的 IGF-I 的培养基体外培养能明显增加粘蛋白和Ⅱ型前胶原的 mRNA 表达, 但比软骨细胞培养对照组弱, 提示 TGF-β1 和 IGF-Ⅰ序贯应用可以增加 MSCs 向软骨方向的分化, 但始终不能完全分化为软骨细胞。Hanada 等[12]观察了地塞米松及 bFGF 作用下大鼠骨髓 MSCs 体外培养增殖和分化都明显增强了, 地塞米松及 BMP-2 组仅轻微增加骨结节和钙含量, 而地塞米松加 bFGF 和 BMP-2 组 MSCs 增殖和分化比上述两组都明显增强; 把上述三组细胞分别复合多孔的磷酸钙陶瓷后体内实验也得到同样的结果。实验说明, 单独使用 BMP-2 对骨髓 MSCs 成骨性能影响不大, 但能放大地塞米松和 bFGF 对骨髓 MSCs 增殖和分化的促进作用。说明诱导剂间的相互作用对诱导分化有显著的影响。

最近, Zhou 等[15]用 10^{-7} mol/L 的雌激素 E2 处理体外培养的鼠 MSCs 后, 明显增强了雌激素受体(ER Estrogen Receptor)-α、ALP、Ⅰ型胶原、TGF-β1、BMP-2 的 mRNA 水平和表达量并促进了 MSCs 增生, 减弱了 ERβ 的 mRNA 水平和表达并减少了细胞凋亡。在去卵巢骨质疏松小鼠和正常小鼠来源的 MSCs 都得到上述结果, 由此可见, 除细胞因子外, 雌激素 E2 也能促进 MSCs 向成骨分化。

由此可见, 多种细胞因子、激素和化学药物都对 MSCs 有诱导分化作用。这些诱导剂发挥作用的机制、诱导剂间的相互作用、最佳效量比和序贯应用的方法等问题的解决将对 MSCs 的推广应用起重要作用。

4　MSCs 的载体

基因工程中载体的选择也是研究的重点之一, 不同种类的组织工程对载体的要求也不尽相同。总的来说, 理想的载体应该具备良好的组织相容性、适当的机械性能、合适的孔率、低免疫原性、体内无毒降解等条件, 选择 MSCs 最适载体的研究工作取得一些进展。

Tang[16]比较了冻干松质骨和羟基磷灰石复合人 MSCs 在裸鼠皮下植入模型不同时期成骨的组织学差异, 认为冻干松质骨明显比羟基磷灰石更有利于成骨。说明不同的载体对组织的修复效果有影响。Petite 等[17]分别用珊瑚支架复合 MSCs 的组织工程骨、珊瑚支架复合红骨髓、及单独使用珊瑚支架修复羊大段骨缺损模型, 结果珊瑚复合 MSCs 组临床愈合率明显高于其它组, 证明了 MSCs 在骨、软骨修复方面的优势, 也证明珊瑚适合作为 MSCs 的载体。

在软骨组织工程方面, Ponticiello 等[18]用成人 MSCs 复合可吸收明胶海绵, 并在培养基中加入 10 ng/ml TGF-β3 共同培养 21 d 后, 发现有硫酸葡糖胺聚糖及Ⅱ型胶原等软骨样细胞外基质的形成, 且细胞密度为 12×10^6/ml 组的软骨样细胞外基质产量明显高于以其它密度组。认为明胶海绵是复合 MSCs 修复软骨的理想载体, 不同的细胞密度生成的软骨样细胞外基质产量也不同。Mason 等[19]用聚羟基乙酸(Poly glycolic acid, PGA)作载体培养组织工程软骨也取得成功。

在肌肉和肌腱组织工程方面, Young 等[20]观察了 MSCs 复合胶原修复兔跟腱缺损模型的力学、组织学和功能恢复明显好于对照。Awad 等[21]比较了 MSCs 复合Ⅰ型胶原和单用胶原修复兔髌腱术后四周的生物力学和显微结构, 认为 MSCs 复合Ⅰ型胶原组生物力学性能明显较对照组强(最大张力、弹性模量、应变能量密度分别比对照组强 26%($P<0.001$), 18%($P<0.01$), 和 33%($P<0.05$), 说明Ⅰ型胶原能作为腱组织工程的合适载体。

有的学者研究组织工程骨复合分化诱导剂的缓释系统以达到长时间促进 MSCs 增殖和分化的目的, 最终进一步促进成骨。Peter 等[22]将 TGF-β1 与 PLGA 和 PEG 混合形成的微粒结合, 在体外实验证明能长时间释放 TGF-β1 并促进 MSCs 增殖和分化。用缓释系统延长分化诱导剂对 MSCs 的作用时间以加强组织工程中 MSCs 的增殖和分化是应用研究的一个新方向。

5　MSCs 的基因修饰

MSCs 更新率低而代谢活力高, 可通过转基因技术获得目标基因并在体内外长期高效的表达。有学者将 BMP-2、TGFβ1 等分化诱导剂的基因转入 MSCs, 使其长期表达相应目标基因、并通过自分泌或旁分泌方式作用于 MSCs 自身及临近细胞, 从而达到促进定向分化和增殖的目的。这种把基因工程和组织工程有机结合起来的方法有人称为: 基因增强的组织工程(Gene-enhanced tissue engineering)[19]。

Cheng 等[2]用腺病毒转染 BMP-2 基因到成年新西兰兔 MSCs, 体外培养 1 周后可以检出 BMP-2 表达; 转染的 MSCs 能够向成骨系细胞方向分化, 与未转染及空白转染对照组相比, 实验组Ⅰ型胶原、骨桥接素、骨钙素的 mRNA 表达明显增强; 再将转染的 MSCs 移植到自体脊柱腰 5、6 横突间隙, X 线检查和组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

织学证实腺病毒转染 BMP-2 基因的 MSCs 组有明显成骨，而空白转染组无成骨。在进一步的研究中，Moutsatsos 等[3] 利用遗传工程技术把四环素可调控表达的载体编码的 BMP-2 基因转入 MSCs，在体外、体内实验中证明可以用强力霉素控制 BMP-2 基因的表达，从而实现 MSCs 成骨分化的可控性。Mason 等[19] 用腺病毒转染 BMP-7 基因到兔 MSCs 体外实验证实有 BMP-7 表达，在兔膝关节软骨缺损模型中这种基因修饰的组织工程的软骨修复时间和质量明显优于对照。国内，郭晓东等[23] 已经成功地用脂质体把 TGF-β1 基因转入人 MSCs，在体外有效表达并刺激Ⅱ型胶原的生成；同时，观察转基因 MSCs 双层软琼脂培养 10～14 d 未见细胞克隆形成，认为转基因的 MSCs 无恶变倾向。基因修饰的组织工程加强了 MSCs 的修复作用，是目前种子细胞研究的一个热门之一，其技术方法、生物安全性和基因表达的时间和强度的可控性等方面有待深入研究。

综上所述，由于 MSCs 具有干细胞的传代和多向分化能力等优良特性，使得它在组织工程中具有广阔的应用前景。目前，在 MSCs 的分离纯化技术、分化方向的调控、载体的选择、基因修饰等方面尚有待深入研究。

关键词：骨髓间充质干细胞；组织工程
中图法分类号：R318.08；R322.71 文献标识码：A

参考文献：

[1] Pittenger F, Mackay A, Beck S, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(4): 143－147.

[2] Cheng S L, Lou J, Wright N M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68(2): 87－94.

[3] Moutsatsos I K, Turgeman G, Zhou S, *et al*. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration[J]. Mol Ther, 2001, 3(4): 449－461.

[4] Majumdar M K, Thiede M A, Haynesworth S E, *et al*. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCss) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(6): 841－848.

[5] Chopp M, Zhang X H, Li Y, *et al*. Rosenblum, -MSpinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neuroreport, 2000, 11(13): 3001－3005.

[6] Li Y, Chen J, Wang L, *et al*. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells[J]. Neurology, 2001, 56(12): 1666－1672.

[7] Kadiyala S, Young R G, Thiede M A, *et al*. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125－134.

[8] Zohar R, Sodek J, McCulloch C A. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry[J]. Blood, 1997, 90(9): 3471－3481.

[9] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 67－73.

[10] Cooper L F, Harris C T, Bruder S P, *et al*. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis[J]. J Dent Res, 2001, 80(1): 314－320.

[11] Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen E F, *et al*. 1, 25-Dihydroxy vitamin D3 stimulates the production of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3 and -4 in human bone marrow stromal cells[J]. Eur J Endocrinol, 2001, 144(5): 549－557.

[12] Hanada K, Dennis J E, Caplan A I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(10): 1606－1614.

[13] Worster A A, Nixon A J, Brower-Toland B D, *et al*. Effect of transforming growth factor β1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2000, 61(9): 1003－1010.

[14] Worster A A, Brower-Toland B D, Fortier L A, *et al*. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-β1 in monolayer and insulin-like growth factor-Ⅰ in a three-dimensional matrix[J]. J Orthop Res, 2001, 19(4): 738－749.

[15] Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, *et al*. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice[J]. J Cell Biochem, 2001, (36 Suppl): 144－55.

[16] Tang T T, Lu H, Dai K L. Osteogenesis of freeze-dried cancellous bone allograft loaded with autologous marrow-derived mesenchymal cells[J]. Materials Science and Engineering, 2002, 20: 57－61.

[17] Petite H, Viateau V, Bensaid W, *et al*. Tissue-engineered bone regeneration[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(9): 959－963.

[18] Ponticiello M S, Schinagl R M, 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.

[19] Mason J M, Breitbart A S, Barcia M, *et al*. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering[J]. Clin Orthop, 2000, (379 Suppl): S171－178.

[20] Young R G, Butler D L, Weber W, *et al*. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair[J]. J Orthop Res, 1998, 16(4): 406－413.

[21] Awad H A, Butler D L, Boivin G P, *et al*. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon[J]. Caplan A ITissue Eng, 1999, 5(3): 267－277.

[22] Peter S J, Lu L, Kim D J, *et al*. Effects of transforming growth factor beta1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly(prophylene fumarate) substrates[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 50(3): 452－462.

[23] 郭晓东，杜靖远，郑启新，等. TGF-β1 基因转染间充质细胞的量效关系及安全性研究[J]. 同济医科大学学报，2001，30(2)：125－128.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net