

综述

骨髓基质干细胞及其在脊髓组织工程中应用的研究进展

郭树章,任先军

(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

中图分类号:Q813.1,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-10-0620-03

脊髓损伤的治疗一直是医学上的难题,世界各地医务工作者都在积极探索有效的治疗方法。近年来组织工程研究的兴起,为脊髓损伤的修复提供了一条新的途径。种子细胞的选择是组织工程中研究的热点。全能干细胞和多能干细胞具有高度自我更新能力和多向分化潜能,是组织工程中重要的靶细胞。目前研究较多的有神经干细胞、胚胎干细胞、嗅鞘细胞、雪旺细胞、脐血干细胞及骨髓基质干细胞等。胚胎组织移植存在伦理道德和免疫排斥等问题。神经干细胞、嗅鞘细胞及雪旺细胞的来源均有限,且取材不便。骨髓基质干细胞(BMSCs)是骨髓中的另一类干细胞,来源于中胚层未分化的间充质细胞,因其具有向多种中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力,因而又被称为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。因其形状呈成纤维细胞样,最初被称为“集落形成单位成纤维细胞”(colony-forming units fibroblasts, CFU-F)。骨髓基质干细胞在一定外界环境条件下能实现跨胚层分化,而且分化方向已定的细胞可以在一定诱导条件下转向分化,所以最近国外文献多称其为间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells, MPC)。具有多向分化潜能,因其来源丰富、取材简便、容易分离纯化培养,并在一定培养条件下可迅速扩增,且自体移植不存在伦理道德和免疫排斥等问题,是较理想的种子细胞。

1 BMSCs 的生物学特性

1.1 表面标志

BMSCs 表达的表面标志抗原具有非单一性,它表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志,目前没有找到 BMSCs 的特异性抗原标记,骨髓基质干细胞主要表达的标志见表 1^[1]。

Lin 等^[2]对人的 BMSCs 培养发现,其能表达 CD13、CD29 和 CD59,而不表达 CD11、CD14、CD31、CD34、CD45、CD80、CD86、CD117 和 HLA-DR。

1.2 形态学特征

尽管不同实验室获得 BMSCs 的培养方法略有差异,但从培养的结果看,他们所获得的 BMSCs 在外部形态上都成纺锤形或星形的成纤维细胞状。细胞接种后 48h 出现

表 1 骨髓基质干细胞主要表面标志

标志物类型	标志物名称
特殊抗原	SH2,SH3,SH4,STRO-1, α -平滑肌肌动白, MAB1740
细胞因子和生长因子	白介素-1 α 、6、7、8、11、12、14、15, LIF, SCF, Flt-3 配体, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
细胞因子和生长因子受体	IL1-R, II-3R, II4-R, II-6R, II-7R, LIFR, SCFR G-CSFR, IFN γ R, TNF1R, TNF2R, TGF β 1R TGF β 2R, bFGFR, PDGFR, EGFR
粘附分子	整合素 α v β 3、 α v β 5, 整合素链: α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α v、 β 1、 β 3、 β 4, ICAM-1、2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-选择素, endoglin, CD44
细胞外基质	I、III、IV、V、VI 型胶原, 纤维连接蛋白, 层粘连蛋白, 透明质酸, 蛋白多糖

纺锤形改变并开始贴壁生长。7~10d 细胞呈多种形态外观:星形、三角形、多角形和长梭形等,细胞呈团簇状生长,分布不均,显示出集落生长趋势。至 14d 左右,细胞融合成单层。Prockop 等^[3]把人骨髓基质干细胞以 3 个/cm² 的密度接种在培养基上,然后用相差显微镜观察,发现三类形态不同的细胞:一类体积较大,复制缓慢;一类呈纺锤形,复制迅速;另一类是直径 7 μ m 的小细胞,繁殖速度非常快,称之为 RS(rapidly self-renewing)细胞。RS 细胞与在同一培养基中的其它细胞相比有不同的表位和蛋白表达谱系,同时也具有多向分化潜能,他认为 RS 细胞是较为理想的种子细胞。

2 BMSCs 的分离培养

由于 BMSCs 的数量较少,成人骨髓中平均 1 $\times$ 10⁵~1 $\times$ 10⁶ 个有核细胞中含有 1 个,并随着年龄的增加,细胞数量逐渐减少。在生理状态下有 20% 为静止细胞,因此必须运用能使其迅速扩增又保持未分化状态的培养方法来培养细胞。目前常用的 BMSCs 分离方法主要有 4 种:密度梯度离心法、贴壁筛选法、流式细胞仪法和免疫磁性选择法。较常用的是前两种。

2.1 密度梯度法

根据 BMSCs 与其它细胞的密度不同进行分离,将获得的骨髓过滤以去除骨髓,再用 Dulbecco 低限量必需培养基(DMEM)或 α -低限量培养基(α -MEM)制成细胞悬液,

第一作者简介:男(1975-),主治医师,在读硕士,研究方向:脊柱外科
电话:(023)68774081 E-mail:gszlc@yahoo.com.cn

加入分离液(目前常用的有 Percoll 分离液,密度 1.073g/ml 和 Ficoll 分离液,密度 1.077g/ml)离心,建立密度梯度,BMSCs 一般位于界面层(单核细胞层),吸取细胞后置于培养基中进行培养。Pittenger 等^[4]发现,通过密度梯度离心培养的 BMSCs 在第一代纯度可达 95%,第二代达 98%。

2.2 贴壁筛选法

利用 BMSCs 与造血细胞贴壁性能不同的特点,培养一段时间后,造血细胞因不贴壁而死亡或随换液除去,BMSCs 得以纯化而继续培养。

2.3 流式细胞仪筛选法

根据 BMSCs 细胞体积小,相对缺少颗粒的特性对其加以分离。

2.4 免疫磁性选择法

根据免疫学原理,利用包有抗体的磁珠与 BMSCs 表面抗原特异结合,在一定强度磁场下被滞留而分离。Quirici 等^[5]用低亲和性神经营养素受体抗体标记原始的 BMSCs,用免疫磁性选择法进行纯化,经培养后检查发现,可以得到较为均一的细胞。

2004 年 Matsubara 等^[6]介绍了一种新的 BMSCs 扩增方法,在培养皿上覆盖由 PYS-2 细胞(卵黄囊壁细胞)产生的基底膜样细胞外基质(bmECM),能显著提高生长率和分化寿命,BMSCs 在扩增到 10^6 倍时仍具有多向分化能力。

3 BMSCs 的鉴定

到目前为止尚未发现特异性标志物来鉴定 BMSCs,主要根据其形态学特征、表面标志和成骨特性来综合鉴定。

4 BMSCs 的诱导分化

BMSCs 在体外培养时,能保持干细胞的特性自身不断地增殖,在不同诱导条件下能够向不同谱系分化。对于向神经方向诱导分化,不同的实验室所用诱导剂各不相同。主要是抗氧化剂和神经因子两类,目前体外诱导神经细胞分化的试剂主要有:维甲酸(RA)、生长因子、 β -巯基丙醇(BME)、二甲亚砜(DMSO)、丁化羟苯基甲醚(BHA)、脱甲基试剂、单唾液酸神经节苷脂(GM-1)等。Jin 等^[7]用表皮生长因子、成纤维细胞生长因子-2、维甲酸和神经生长因子诱导 5 周后,BMSCs 分化成神经元样细胞,并表达了神经元标志。Sanchez-Ramos 等^[8]用表皮生长因子(EGF)或脑源性神经营养因子(BDNF)诱导后表达巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经特异性核蛋白(NeuN)。Zhang 等^[9]将纯化的大鼠 BMSCs 分成三组,第一组单独加入 bFGF,第二组单独加入 GM-1,第三组加入 bFGF 和 GM-1。3d 后免疫组化法检测到纤维连接蛋白和 I 型胶原;此后,纤维连接蛋白和 I 型胶原迅速减少,而巢蛋白则显著增加;7d 后检测到神经元特异性烯醇化酶(NSE)、GFAP、半乳糖苷酶(GalC)。此后 NSE 和 GFAP 阳性的细胞明显增加,bFGF 和 GM-1 联合组变化最大,但是单独加入 GM-1 并无诱导作用。因此认为 bFGF 和 GM-1 有协同促进 BMSCs

分化的作用。Garcia 等^[10]用雄性大鼠长骨获取 BMSCs 后,在加入了 20% 的胎牛血清的 DMEM 液中培养,第 6 次传代后,用 TriZol 反应分离全部 RNA,用 RT-PCR 检测发现大鼠 BMSCs 表达神经生长因子(NGF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)。国内用中药丹参、当归、麝香、黄芩甙对 BMSCs 进行诱导均已获成功^[11-14]。

5 BMSCs 在脊髓组织工程中的应用

Akiyama 等^[15]把体外培养的大鼠 BMSCs 用显微注射法注入免疫抑制大鼠的脱髓鞘脊髓中,发现能导致再髓鞘化。再髓鞘化的轴突既有中枢神经系统的特征又有周围神经系统的特征,轴突的传导速度也有所提高。Hofstetter 等^[16]对 BMSCs 分化的神经干细胞样细胞进行电生理检查,虽然并不能产生电压门控的动作电位,但是把 BMSCs 移植大鼠损伤的脊髓 1 周后发现存活的细胞明显增多,步态也大有改善,5 周后组织学检查发现 BMSCs 与未成熟的纵向排列的星形胶质细胞紧密地结合在一起,在脊髓损伤中心形成束状桥接。在移植与瘢痕组织界面发现了神经丝阳性和 5-羟色胺阳性的束状纤维,表明 BMSCs 能对脊髓细胞生长提供生长引导并促进功能恢复。Chopp 等^[17]把 BMSCs 注入挫伤 1 周的脊髓,以磷酸缓冲盐作为对照,5 周后 BBB 评分显示实验组动物运动功能明显改善,免疫组化检查发现一些 BMSCs 源性的细胞表达神经蛋白标志物。Wu 等^[18]将大鼠 BMSCs 与胎儿脊髓源性的神经球细胞共同培养发现能明显促进神经球细胞增生和分化;他们又把 BMSCs 移植到受损脊髓,发现能通过增加病变组织的修复促进脊髓再生,病变部位遗留的空腔较对照组明显变小。虽然移植的细胞逐渐减少,但是接受治疗的动物有显著的功能恢复。

6 应用前景

BMSCs 作为一种多潜能干细胞具有与其它细胞来源无法比拟的优势:获取方便,来源丰富,不涉及伦理道德问题,无需二次手术;体外培养扩增快速,能定向诱导分化;在宿主组织中可长期生存并进行整合,无免疫排斥的问题等。动物实验证明用体外培养扩增的 BMSCs 来修复脊髓损伤具有良好的效果。因此,成人 BMSCs 是一种理想的细胞来源,为脊髓损伤的细胞移植和基因治疗提供了新的思路 and 前景。然而在 BMSCs 安全有效地用于临床之前,还面临着一些亟待解决的问题:目前的成果多数是在啮齿类动物模型上取得的,有待于在人类得到证实;Rismanchi 等^[19]研究发现将细胞从培养液中移出后 NeuN 的表达明显下降,从而认为分化程序显著影响 BMSCs 的潜能,要维持神经抗原的免疫活性,必须依靠特殊的、非生理性的条件。将诱导分化后的细胞进行移植后在生理条件下能否继续分化并发挥神经元功能需进一步研究。但总的来说,BMSCs 因其多向分化潜能及其巨大的优势,可成为一种较理想的种子细胞,为脊髓损伤的治疗研究开辟了一条新的途径。

综述

脊髓组织工程构建中的种子细胞

王树森, 罗卓荆

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 710032 西安市)

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0622-03

目前对脊髓损伤仍缺少有效的治疗措施。近年来促进脊髓功能恢复的策略主要有: (1) 应用神经营养因子促进轴突的存活与再生; (2) 应用下游信号分子促进轴突的再生; (3) 中和使轴突再生失败的抑制性分子; (4) 细胞移植。细胞移植治疗脊髓损伤的目的主要有两个, 一是在损伤后形成的囊腔为再生轴突提供支架; 二是替代损伤缺失的细胞和组织。目前随着组织工程和神经科学的发展, 人们逐渐意识到解决脊髓损伤的关键在于神经的组织工程。因

此, 在脊髓组织工程构建中选择合适的种子细胞成为重要的一环, 现对脊髓组织工程构建中种子细胞的研究进展综述如下。

1 嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)

OECs 既具有周围神经系统雪旺细胞的特性, 也具有中枢神经系统星形胶质细胞的特点。嗅神经是体内唯一可以在成体有规律再生的中枢神经, OECs 就存在于具有终生再生功能的中枢神经嗅球中的大胶质细胞, 可在整个神经通路中对再生的神经纤维包裹保护, 防止轴突与周围的其它胶质细胞接触, 形成适合神经轴突生长的微环境^[1]。因此, OECs 为自体移植提供了可能性。Ramaon-Cueto^[2]在大

第一作者简介: 男 (1968-), 医学博士, 主治医师、讲师, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (029)83375288 E-mail: Wangss@fmmu.edu.cn.

7 参考文献

1. Minguell J J, Erices A, Conget P, et al. Mesenchymal stem cells [J]. Experimental and Biological Medicine, 2001, 226 (6): 507-520.
2. Lin JR, Guo KY, Li JQ, et al. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells [J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 251-253, 264.
3. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC, et al. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells [J]. Cytotherapy, 2001, 3 (5): 393-396.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multineage potential adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284: 143-147.
5. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies [J]. Exp Hematol, 2002, 30(7): 783-791.
6. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313: 503-508.
7. Jin K, Mao XO, Bateur S, et al. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression [J]. Exp Neurol, 2003, 184 (1): 78-79.
8. Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-256.
9. Zhang H, Wang JZ, Sun HY, et al. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation [J]. Chin J Traumatol, 2004, 7(1): 3-6.
10. Garcia R, Aguiar J, Alberti E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316 (3): 753-754.
11. 杨立业, 刘相名, 惠国桢, 等. 丹参诱导鼠骨髓间充质细胞向神经元分化 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2003, 2(1): 29-32.
12. 刘金保, 董晓先, 董燕湘, 等. 当归诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. 广东医学, 2003, 24(5): 466-468.
13. 肖庆忠, 温冠媚, 李浩威, 等. 麝香组分诱导成年大鼠骨髓间充质干细胞体外定向分化为神经元样细胞的能力 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(6): 405-408.
14. 贾延劫, 杨于嘉, 周燕, 等. 黄芩素诱导大鼠骨髓基质细胞向神经细胞分化的研究 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82 (19): 1337-1341.
15. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD, et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells [J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6623-6630.
16. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2199-2204.
17. Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation [J]. Neuroreport, 2000, 11(13): 3001-3005.
18. Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord [J]. J Neurosci Res, 2003, 72(3): 343-351.
19. Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, et al. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols [J]. Brain Res, 2003, 991(1-2): 46-55.

(收稿日期: 2004-10-12 修回日期: 2005-03-09)

(本文编辑 卢庆霞)