

骨髓间充质干细胞及其在椎间盘组织工程中应用的研究进展

陈国仙, 王万明

(南京军区福州总医院骨科 350025 福州市)

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2007)-06-0461-04

随着组织工程和细胞治疗学的兴起, 寻找满足要求和易于操作的种子细胞和靶细胞已成为其中的关键环节。干细胞因具有高度的自我更新能力和多向分化潜能, 已成为组织工程中首选的种子细胞。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一群存在于骨髓中的非造血干细胞, 其作为组织工程的种子细胞具有诸多优势: 首先, BMSCs 取自骨髓, 来源充足, 取材相对较容易; 其次, BMSCs 体外分离培养操作简单, 细胞数通过培养可获得大量扩增; 另外, BMSCs 免疫原性低, 移植引起的排斥反应相对较轻; 最后, 可作为靶细胞, 便于外源基因的转染和表达调控^[1-2]。这些优势使 BMSCs 在基因治疗中具有较好的应用前景, 近年来已成为椎间盘组织工程研究的热点, 现就 BMSCs 的生物特性及其在椎间盘组织工程中的应用的研究进展作一综述。

1 BMSCs 的生物特性

骨髓中 MSC 含量极少, 大约每 10^5 个单个核细胞中仅含有 1 个 MSC, 并随着年龄增大或体质衰弱而减少^[3]; 其具有多向分化的潜能, 在体外培养的过程中有自发分化和衰老的现象。有研究表明^[4], BMSCs 在体外可以增殖 40 代, 在传代过程中逐渐丧失向脂肪和软骨细胞分化的能力, 导致最终只可以向骨细胞分化; 在体外干预因素下和体内微环境下可以向中胚层组织细胞分化(骨细胞^[5]、软骨细胞^[6]、脂肪细胞^[7]、心肌细胞^[8]、内皮细胞^[9]等), 也可以跨胚层分化(内胚层的肝细胞^[10]和外胚层的神经细胞^[11])。多向分化潜能为 BMSCs 的广泛应用提供了理论基础, 经过特殊条件诱导培养后, BMSCs 可以分化为相应组织, 对组织损伤可以起到修复作用。

1.1 细胞形态

在光镜和相差显微镜下 BMSCs 显示出类似成纤维细胞外观。透射电镜下 BMSCs 有两种不同形态结构^[12]: 一种处于相对静息状态的细胞, 核较大, 椭圆形, 仅含 1 个核仁, 核质比大, 胞质内细胞器少; 另一种是处于相对活跃期细胞, 细胞体积大于前者, 核不规则, 有核袋及核突, 含 2~3 个核仁, 核质比小, 胞质内有丰富的细胞器。

1.2 细胞周期

BMSCs 在体外培养条件下生长与其他细胞一样, 经历生长滞缓期、对数增殖期和生长平台期。对细胞周期的研究发现, 只有少数 BMSCs 处于活跃复制期(大约有 10% 处于 S+G2+M 期), 而大多数细胞处于静止期(G0/G1 期), 高比例的 G0/G1 期细胞暗示着 BMSCs 具有高度的分化潜能, 传代培养时, BMSCs 表现出了高度的扩增能力, 且保持着细胞的染色体核型和端粒活性^[13]; 但过多的传代培养会损坏细胞的功能, 甚至会出现 BMSCs 的凋亡^[14]。Conget 等检测人 BMSCs 中有 20% 的细胞处于 G0 期, 足以维持增殖分化所需的细胞供给, 在经体外传 20~25 代后, 细胞形态、生长曲线及免疫表型仍无明显变化^[14]。

1.3 BMSCs 的分离与培养

目前 BMSCs 的分离方法主要有密度梯度离心法、贴壁筛选法、流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法 4 种。流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法对细胞活性影响较大, 甚至导致细胞完全失去活性, 并且实验条件要求高, 需要骨髓量大; 而密度梯度离心法比贴壁筛选法复杂, 但比贴壁筛选法的纯度高, 所以现在用得比较多的是密度梯度离心法和贴壁筛选法。

二维培养技术已普遍采用, 尽管逐步得到改善, 但仍存在难以克服的缺点^[15]: (1) 贴壁的表面有限, 细胞产量低; (2) 无菌操作过程繁琐, 容易污染; (3) 代谢产物逐渐堆积, 排除不及时易引起细胞生长不良甚至退化; (4) 细胞离开了体内同细胞外基质共同构成的三维立体结构, 生物学行为受到影响, 容易变异。因此, 有人提出三维培养的思想。Glowacki 等^[16]用胶原海绵作为载体进行三维灌注培养, 减少了代谢产物的聚集, 结果发现细胞外基质含量提高, 所培养的细胞活性和功能均加强。有研究证明^[17], 动态培养对体外构建三维组织的形态和质量均高于常规静止培养方法。生物反应器可以显著改善体外培养时的营养交换状况^[18]。大载体生物反应器已成功用于某些动植物细胞的大规模离体培养, 能否将其用于 BMSCs 的扩增培养并形成产业化, 从而满足细胞工程和基因工程对种子细胞量的需求, 还有待于一些问题的顺利解决。

1.4 BMSCs 的鉴定

通过上述的方法分离得到的 BMSCs 多是杂合的细胞群, 不同克隆的分化潜能不同, 即使纯化后的单克隆里的细胞, 培养过程中细胞形态增殖特点也不同; 不同实

实验室条件下分离得到的 BMSCs 在分子表型与分化潜能上也不同。至今还没有公认的、特异性很强的分子标记,一般认为 BMSCs 细胞不表达典型的造血系细胞的抗原 CD34、CD45、HLA-DR;也不表达单核细胞/巨噬细胞抗原 CD14、内皮细胞的特异性标记 CD31 以及淋巴细胞特异性标记 CD11a。目前认为其抗原主要包括以下几类:①黏附分子,如 CD166、CD54、CD102、CD44、CD106 等;②生长因子和细胞因子受体,如白介素-1 受体(interleukin IL-1R)、IL-3R、IL-4R、IL-6R、IL-7R、干扰素受体、肿瘤坏死因子等;③整合素家族成员,包括 CD29、CD49、CD104 等;④特异性抗原,SH2、SH3、SH4、Stro-1、 α -平滑肌肌动蛋白、MAB1740 等;⑤其他,如 CD13、CD71、CD90、CD105 等。所以目前鉴定 BMSCs 主要依赖排除法(测定抗原标记)和生物活性分析(在培养过程中给予适当刺激因子进行诱导分化,从而逆推其为间质干细胞)。

2 BMSCs 的免疫学特性

2.1 免疫原性

文献报道^[22]未分化的 BMSCs 低表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子,不表达 MHC-Ⅱ类分子,即使干扰素(interferon, IFN)- γ 刺激,可上调 MHC-I 类分子和 MHC-Ⅱ类分子的表达,但是 BMSCs 作为同种异体细胞刺激淋巴细胞后,淋巴细胞仍然不能产生免疫反应。说明 BMSCs 免疫原性较低,不会诱导急性排斥反应。

2.2 免疫调节性

BMSCs 在体外可抑制致裂原诱导的脾细胞增殖反应;在体内可以抑制淋巴细胞的增殖和诱导免疫耐受^[19],移植供体来源的 BMSCs 还可使急性移植宿主病的发病时间推迟并延长受者的存活时间^[20],提示 BMSCs 在体外和体内都具有免疫抑制作用。有实验报道^[21, 22]此种免疫抑制既不是免疫豁免也不是免疫耐受,而是 BMSCs 自身对 T 细胞的抑制作用引起的。因此 BMSCs 又同时具有免疫调节作用,可以应用于同种异体间的移植,并可作为一种安全有效的基因治疗载体。

3 BMSCs 在椎间盘组织工程中的应用

BMSCs 在体外适当的培养条件下和体内新的微环境下可以向成软骨细胞转化,幼儿的髓核细胞多为脊索细胞,后期分化为类软骨细胞;与关节软骨中的软骨细胞有所差异,这就说明 BMSCs 有向椎间盘细胞分化的可能。

Sakai 等^[23]首次将 BMSCs 作为椎间盘组织工程的种子细胞。以 Ad-lacZ 标记兔自体 BMSCs 后,与前胶原凝胶载体复合并注射入退变的椎间隙内,4 周后组织切片的 X-gal 染色证实移植的 BMSCs 仍具活力,并可认为移植模型组织中的细胞为从 BMSCs 定向分化而来,成为类似正常椎间盘细胞的纺锤形纵向、层状排列的细胞,这与最初的椎间盘细胞相似。研究表明总蛋白聚糖含量及基质相关

基因在移植细胞的椎间盘中得到显著的再生,椎间盘保持了正常结构并最大可能地延缓了退变^[24]。

Crevensten 等^[25]用 15% 烷凝胶作为载体将荧光标记的 BMSCs 注射到大鼠的尾椎间盘内,在注射后第 7、14 天发现干细胞依然存在于注射的间盘区,但数量明显下降;28 天时发现干细胞数量恢复到原来数量,其存活率是 100%,相对于空白注射组来说,实验组的间盘高度有增加的趋势,表明基质成分合成的增加,该研究结果表明 BMSCs 能在大鼠椎间盘内存活并增值。

Risbud^[26]将鼠的 BMSCs 接种于藻酸盐水凝胶中,分别置于缺氧及正常氧分压下与 TGF- β 1 共培养,发现缺氧状态以及 TGF- β 1 能够刺激细胞高表达金属蛋白酶 2 及 II 型胶原蛋白,并认为促进了干细胞向类髓核细胞分化。

Yamamoto 等^[27]将 BMSCs 与髓核细胞共同培养,结果显示其可促进髓核细胞增殖及基质合成。Sobajima 等^[28]将 BMSCs 与髓核细胞共同培养,检测了 BMSCs 治疗椎间盘退变的可行性,其结论是 BMSCs 在椎间盘环境中有良好的增殖能力,并可成功地将治疗基因带入椎间盘。Le Visage 等^[29]研究证实, BMSCs 与纤维环细胞共同培养能表达出较高的糖氨聚糖,即 BMSCs 与纤维环细胞共同培养可以提高蛋白聚糖的合成。

Sakai 等^[30]的研究发现,在 BMSCs 移植 24 周后,相对于正常组,椎间盘移植动物组退变间盘的高度约为 91%,MRI 信号强度约为 81%;假手术组的退变间盘高度约为 67%,MRI 信号强度约为 60%;该研究表明, BMSCs 移植的椎间盘保留了髓核的环状结构,而假手术组的椎间盘髓核却是辨识不清的结构;免疫组化及基因表达分析表明 BMSCs 移植间盘中蛋白聚糖的积聚得到恢复。

国内赵梓汝等^[31]将在 TGF- β 1 干预下兔 BMSCs 与透明质酸钠植入兔退变椎间盘的模型中,分别于 2、4、6、8 周用间苯三酚分光光度法测定蛋白多糖含量的变化;免疫组化测定 II 型胶原的含量变化。结果原代培养及传代培养显示兔骨髓间充质干细胞具有活跃的增殖倍增能力,并且 8 周内蛋白多糖和 II 型胶原的含量实验组比模型组增高明显,从而延缓椎间盘退变。

4 BMSCs 应用于椎间盘组织工程中所存在的问题及其应用前景

目前,对 BMSCs 的实验及临床应用研究虽已取得了很大的进展,但该领域的研究尚处于探索阶段,以下问题有待解决:(1)BMSCs 的分离、纯化,实验证明,体外的 BMSCs 均为多种细胞的混杂,如何才能有效地获得纯的 BMSCs,有待对 BMSCs 的细胞学特点和分化各阶段细胞标志物的进一步研究。(2)BMSCs 增殖、分化的控制需要合适的条件,如何既能控制增殖,避免形成肿瘤^[32, 33],又能在适当的时候启动所需的分化路径,还有待进一步研究。(3)如何提高所需要细胞的转化率。(4)目前研究还仅限于动物上的初期研究,要想将其应用于临床还需要进行高级动

物及临床前期的研究;(5) 大多数研究都无法说明供体 BMSCs 在受体内的远期作用,其安全性仍是人们非常关注的问题;但由于 BMSCs 有上述的优势,是具有细胞治疗和基因治疗临床某些疾病潜在实用价值的有效载体。

总之,随着对 BMSCs 研究的不断深入及其应用于椎间盘组织工程后,结果令人鼓舞,其前景也十分广阔。但同时还面临着许多具体问题需要解决。相信在不久的将来,随着人们对 BMSCs 的研究进一步深入,BMSCs 可作为细胞移植治疗椎间盘退变疾病的重要细胞来源,从而为临床解决髓核摘除后引发的椎间盘退变提供一种新的思路。

5 参考文献

- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells:biology and potential clinical uses[J].Exp hematol,2000,28(8):875-878.
- Yoo JU,Mandell I, Angele P, et al. Chondrogenitor cells and gene therapy[J].Clin Orthop,2000,379(Suppl):164-170.
- David CC,Reiner C,Catla M,et al. Rapid expansion of recycling stems cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J].Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(7):3213-3218.
- 路艳蒙,傅文玉,朴关杰,等.人骨髓间充质干细胞的超微结构[J].电子显微学报,2002,21(4):373-376.
- Muraglia A,Cancedda R,Quarto R,et al. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model [J].J Cell Sci,2000,113(7):1161-166.
- Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts[J].Exp Cell Res,2004,294(2):468-468.
- Kim KW,Lim TH,Kim JG,et al.The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs[J].Spine,2003,28(10):982-990.
- Janderova I,McNeil M,Murrell AN,et al.Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis[J].Obes Res,2003,11(1):65-74.
- Itescu S,Schuster MD,Kocher AA.New directions in strategies using cell therapy for heart disease [J].J Mol Med,2003,81(5):288-296.
- 顾丽丽,彭贵祖,刘德伍.骨髓间充质干细胞向肝细胞转化的研究进展[J].国外医学·生物医学工程分册,2005,28(2):113-116.
- Lee KD,Kuo TK,Whang-Peng J,et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells[J].Hepatology,2004,40(6):1275-1284.
- Dezawa M,Kanno H,Hoshino M, et al. Special induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation [J].J Clin Invest,2004,113(12):1701-1710.
- Tamir A,Petrocelli T,Stetler K, et al. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes;a role for P27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest [J].Cell Growth Differ,2000,11(3):269-277.
- Conget PA,Minguell J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J].J Cell Physiol,1999,181(1):67-73.
- Aung T,Miyoshi H,Tun T,et al. Chondroinduction of mouse mesenchymal stem cells in three-dimensional highly porous matrix scaffold[J].J Biomed Mater Res,2002,61(1):75-82.
- Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS. Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture[J].cell Transplant,1998,7(3):319-326.
- Solchaga LA,Seidel J,Zeng L,et al. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds [J].J Faseb,2002,16(12):1691-1694.
- Sikavitsas VI,BancroftGN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor.J Biomed Mater Res,2002,62(1):136-148.
- Zhao RC,Liao L,Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy [J].J Lab Clin Med,2004,143(5):284-291.
- 李浩威,温冠媚,肖庆忠,等.供者源性的骨髓间充质干细胞对急性移植抗宿主病的影响[J].中国病理生理杂志,2003,19(5):577-580.
- Tse WT,Pendleton JD,Beyer WM,et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation[J].Transplantation,2003,75(3):389-397.
- Le Blanc K,Tanamik C,Rosendahl K,et al. HI A expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells[J].Exp Hematol,2003,31(10):890-896.
- Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc;a potential therapeutic model for disc degeneration[J].Biomaterials,2003,24(20):3531-3541.
- Sakai D,Mochida J,Iwashina T,et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model:potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration[J].Spine J,2005,30(21):2379-2387.
- Crevensten G,Walsh AJ,Ananthakrishnan D,et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration:mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs [J].Ann Biomed Eng,2004,32(3):430-434.
- Risbud MV,Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro:implications for cell-based transplantation

综述

骨髓间充质干细胞移植治疗腰椎间盘突出退变的研究进展

赵 鑫, 侯铁胜

(第二军医大学附属长海医院骨科 200433 上海市)

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-06-0464-03

腰痛是骨科的常见症状, 给患者和社会带来了沉重的负担。研究表明大多数腰痛和椎间盘退变有关^[1], 而目前的治疗都只能缓解症状, 不能逆转椎间盘退变。随着对椎间盘退变病理认识的深入, 采用生物学方法逆转椎间盘退变成为可能。细胞治疗和组织工程就是其中方法之一。笔者对骨髓间充质干细胞(BMSC)作为种子细胞治疗椎间盘退变的研究进展做一综述。

1 BMSC 作为种子细胞的优势和可行性

生物学治疗中的种子细胞, 要求来源广泛、易得、生物活性好、不引发免疫排斥。在椎间盘退变治疗中, 研究较多的种子细胞有下面几种: (1) 自体椎间盘细胞。存在取材困难, 离体后扩增培养时间长等技术问题; 而且宿主本身椎间盘退变, 相邻节段往往也有不同程度的退变, 因此所获得的椎间盘细胞生物活性差。(2) 胚胎干细胞。具有多向分化的能力, 生物活性强, 但因伦理道德方面的争议, 同样面临来源问题。(3) 成人 BMSC。保留了多向分化的能力, 来源广泛, 生物活性强, 较上述细胞有着不可比拟的优势。同种异基因 BMSC 对宿主的 T 细胞免疫反应有免疫抑制效应, 可减小免疫排斥^[2], 使异基因 BMSC 的临床应用存在可能, 增加了干细胞来源。

在成人骨髓中大约每 $10^4 \sim 10^6$ 个细胞中有 1 个 BM-

SC, 而且 BMSC 的数量随年龄增长逐渐衰减。BMSC 表达 CD44、CD71、CD90、CD105、CD120a、CD124、CD166 等表面抗原, 不表达造血系统细胞的标志^[3,4]。在体外培养可以进行分离、纯化。在培养过程中, 不同条件的诱导刺激对 BMSC 向不同方向的细胞分化有重要影响。多数学者认为 BMSC 有能力向软骨、骨、脂肪和肌肉组织分化^[3,5]。

2 BMSC 治疗椎间盘退变的体外实验研究

体外实验诱导干细胞分化的最常见方法是使用细胞因子刺激。Steck 等^[6]采用三维培养 BMSC, 用转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 刺激, 成功诱导 BMSC 向软骨样细胞分化。使用 cDNA-array 技术检测相关的 45 个基因发现, 将分化后的干细胞基因表达特征与软骨细胞和椎间盘细胞比较, 其更接近椎间盘细胞。

细胞因子可以诱导干细胞分化, 周围环境对分化也有一定影响。因成人椎间盘是没有血供的组织, Risbud 等^[7]模拟椎间盘低氧环境, 对 BMSC 向髓核样细胞分化进行了研究。作者在藻酸盐支架中三维培养大鼠 BMSC, 培养液中添加 TGF- β 进行诱导, 分别在低氧 (2% O_2) 和正常氧含量 (20% O_2) 环境下培养, 采用流式细胞仪、半定量逆转录 PCR 和 Western blot 等方法来检测。结果表明在低氧条件下, 分化后的干细胞在基因水平和蛋白水平都表达了髓核细胞在椎间盘内的低氧反应产物以及髓核细胞分泌的细胞外基质, 表达的量高于在正常氧含量环境中分化的干细胞; 并且发现了与细胞增殖有关的信号通道, 分裂原激活

第一作者简介: 男 (1975-), 博士研究生, 研究方向: 脊柱外科
电话: (021) 25072075 E-mail: zhaoxin2067@163.com

- tation therapy[J]. Spine J, 2004, 29(23): 2627-2632.
27. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Reinsertion of nucleus pulposus cells activated by mesenchymal stem cells using coculture method decelerated intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2004, 29(14): 1508-1522.
28. Sobajima S, Shimer A, Kim J, et al. Feasibility of stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2004, 4(2): 117-125.
29. Le Visage C, Kim SW, Tateno K, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis [J]. Spine J, 2006, 31(18): 2036-2042.
30. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocol-

- lagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.
31. 赵梓汝, 吴小涛, 祁亚斌, 等. TGF- β 1 干预下体内兔骨髓间充质干细胞对退变椎间盘治疗的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(13): 1019-1022.
32. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation [J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5095-5098.
33. Ruble D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3035-3039.

(收稿日期: 2006-11-22 修回日期: 2007-01-11)

(本文编辑 彭向峰)