

第一节 间充质干细胞技术与骨科应用

一、MSC 简介及其相关技术

(一) MSC 的发现及生物学特性

1. MSC 的发现 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)最初在 20 世纪 60 年代由 Friedenstein 在骨髓中发现。随着近年来对 MSC 研究的深入, MSC 的重要性正逐渐被人们所了解。Cohnleim 于 1867 年在研究伤口愈合时发现, 当他从静脉注入染料 Alaline 后在伤口愈合处发现含有染料的炎症细胞和纤维细胞, 于是他猜测这些细胞来源于骨髓, 在骨髓中可能存在着非造血组织的干细胞。1869 年, Goujon 观察到自体红骨髓异位移植后具有成骨作用。1991 年, Caplan 把这类在骨髓中具有黏附于塑料培养皿表面、在体外能高度扩增, 可多向分化的细胞群命名为骨髓间充质干细胞。1999 年, Dennis 和 Pittenger 分别发现人骨中的 CD34⁺ 间充质干细胞, 证实了人骨髓中存在有非造血的成体干细胞。由于并不是所有的间充质干细胞都满足干细胞活性标准。2005 年国际细胞治疗协会把能贴附塑料壁的成纤维细胞样细胞命名为多潜能间充质基质细胞, 间充质干细胞仅指完全符合干细胞活性标准的细胞, 二者用相同的缩写词 MSC。

2. MSC 的生物学特性 人体内新细胞的诞生要经历细胞增殖、迁移、分化和成熟这一系列过程, 在这个过程中的第一个细胞被命名为干细胞(stem cell)。干细胞具有形成克隆, 自我更新和向多种细胞谱系分化的能力。间充质是胚胎中的一种特殊组

织, 它可以向肌肉组织、骨组织及其他结缔组织分化, 并且能够发育为血细胞和一些其他种类的细胞。MSC 从胚胎间充质发育而来, 起源于中胚层, 是成体干细胞的一种。

MSC 广泛存在于全身结缔组织和器官间质中, 骨髓组织中的含量最为丰富, 人们已经发现 MSC 能分化为中胚层的多种成熟组织细胞。研究表明在骨膜、脂肪组织、骨骼肌、软骨膜、滑液、真皮、成体外周血、脐带血、血管周皮细胞、骨组织、脾脏、羊水和胎盘等其他组织中均有少量 MSC 的存在。其中, 人们对骨髓来源的 MSC 研究最详尽和透彻, 骨髓是公认的包含 MSC 的组织, 具有很好的临床应用前景。骨髓中的 MSC 占有核细胞总数的 0.001% ~ 0.010%, 并随着年龄的增长而减少。通过对 MSC 细胞周期的分析发现, 20% 为 G₀ 期细胞, 大部分细胞处于 G₀/G₁ 期, 表明 MSC 具有高度的分化潜能。骨膜、脂肪组织和骨骼肌也已被证明存在有可利用的价值的 MSC。由于羊膜是废弃的胎儿组织, 没有伦理道德争议, 而且因为没有血管结构避免了培养基内造血细胞的混杂, 羊膜已经成为 MSC 很好的来源之一。另外, 从成人外周血中获取少量 MSC 的方法是否有效可行, 仍有待于研究证实, 如果方法可行, 简单的采血过程会使对 MSC 的采集更加方便。尽管有证据表明 MSC 也存在于真皮、脐带血、血管周皮细胞、骨组织、羊水和脾脏中, 但因为这些组织的数量有限或者不易采集, 它们的临床应用受到了一定的限制。

不同组织来源 MSC 的表型、增殖能力、分化能力和基因表达都有一定的差异。不同的分离方法、培养基、接种浓度、生长因子、供者年龄以及疾病状态等也会影响 MSC 的增殖能力、分化能力和免疫学特性。MSC 在培养皿中一般呈单细胞层生长, 当处

于低氧条件下, MSC 的扩增率可增加 30 倍。用 I 型胶原涂布培养皿或与神经胶质瘤细胞共同培养, 可以促进 MSC 的增殖。Wnt3a、TGF- β_1 、TGF- β_2 会降低 MSC 的增殖能力。由于 TGF- β 、TGF- β R1、Smad3 的内源性表达增加, MSC 的增殖将会受到抑制。MSC 能够分泌 VEGF、bFGF、IGF、G-CSF、SCF、LIF、M-CSF、IL-6 和 IL-11 等多种细胞因子, 具有重要的旁分泌作用。MSC 同时具有间充质、内皮细胞和肌肉细胞的特点, 可以表达一些粘连蛋白, 层粘连蛋白, I ~ IV 型胶原, 蛋白聚糖, 黏附分子和相对特异性抗原等大量细胞外基质分子。MSC 不表达与人白细胞抗原识别有关的共刺激分子 B₇₁、B₇₂ 及主要组织相容性复合物 II 类分子如 HLA-DR 抗原等导致免疫耐受, 属免疫缺陷细胞。

总而言之, 由于 MSC 具有来源广泛、获取容易、扩增能力强、免疫原性低、非致瘤、能归巢和无医学伦理学争议等众多优点而成为再生医学和细胞疗法中所选择的主要细胞。

(二) MSC 的分离与鉴定

1. MSC 的分离 最早应用的 MSC 分离方法是贴壁分离筛选法, 由 Friedenstein 在 20 世纪 70 年代中期建立的。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 在骨髓单个核细胞中所占的比例只有不到 0.1%, 目前在分离过程中很难把造血细胞完全清除。目前在 BMSC 的研究中常用的分离方法有以下几种:

(1) 全骨髓培养法: 根据 BMSC 易于贴壁的特点, 把整个骨髓培养于培养基中, 通过不断的更新培养基来进行纯化。在这个过程中, 红细胞、白细胞及其他造血干细胞会因无法贴壁而随着换液被清除, 留下贴壁的成纤维细胞样细胞, 最终获得 BMSC, 纯度达 95%。此方法操作简单, 所得细胞的分化能力和增殖能力好, 因此被广泛采用。

(2) 密度梯度离心法: 根据密度梯度从骨髓中离心出单个核细胞层, 在含 10% 胎牛血清的培养基中培养, 根据 BMSC 易于贴附于塑料制品的特性进一步纯化分离。培养初期可能有少数造血细胞贴壁生长, 但随着换液和传代, 最后只留下能贴壁的成纤维细胞样的细胞, 最终得到 BMSC。Pittenger 等发现, 通过密度梯度离心法分离培养的 MSC 在第 1 代纯度达到 95%, 第 2 代达 98%。目前常用 Percoll 液 (1.073g/ml) 和 Ficoll 液 (1.077g/ml) 进行密度梯度离心。

全骨髓培养法和密度梯度离心法的比较。利用

免疫荧光法对第 3 代 BMSC 进行检测显示, 用全骨髓培养法获得的细胞与密度梯度离心法获得的相比, CD₄₄ 的阳性表达率和 CD₃₄ 的阴性表达率都要低一些。但是全骨髓培养法的 BMSC 比密度梯度离心法的 BMSC 有更高的细胞活性, 细胞增殖速度更快, 细胞汇合时间更早, 传代时间更短。

(3) 表型分离法: 基于 BMSC 的表型利用抗体对人和鼠类的 BMSC 进行分离的方法。有些利用 BMSC 不具备的特定细胞表面标记物来进行筛选分离, 清除造血细胞系; 另外, 即对 BMSC 进行阳性选择而筛选出所需的细胞。

(4) 纤维蛋白微珠法: 纤维蛋白微珠主要作为一种黏附基质有效地对 BMSC 进行分离。这种方法与塑料黏附法相比能使细胞产量提高 3 ~ 4 倍。

(5) 免疫学分离法: 流式细胞仪法和免疫磁珠法是根据细胞的特性和表面标志进行分选的比较新的分离方法, 这两种方法是利用针对 BMSC 表面抗原的免疫学方法建立起来的, 但是, 因为 BMSC 表面缺乏特异性抗原标记, 对细胞活性影响较大, 分离后的细胞增殖缓慢, 而且实验条件要求高, 分离操作复杂, 费用昂贵, 所以目前应用的不多, 主要用于 BMSC 的鉴定。

2. MSC 的鉴定 目前鉴定 MSC 主要是根据形态和功能等, 由于 MSC 具有多种表面标志物但是缺乏特异性的表面标志物, 并且到目前为止还没有筛选到 MSC 特有的标记分子, 而且不同来源的 MSC 的表面标志物也不同, 对 MSC 的鉴定具有一定的困难。MSC 表达细胞因子和生长因子及其受体、白细胞介素类、黏附分子等具有间质细胞特征和无特异性的表面标记物, 不表达造血细胞系的 CD45、CD34、CD14 等特征性标记物。

目前普遍认为鉴定 BMSC 最可靠的方法是检测细胞分化后产生矿化或骨样化结节。虽然 BMSC 和成纤维细胞都具有塑料贴壁性的特性, 并且两者的细胞表面都表达 CD105 (SH-2)、CD73 (SH-3)、CD166 和 STRO-1, 但是它们之间也有明显的差异。除了分化能力不同之外, BMSC 的 MHC-DR- α 、MHC-DR- β 、MHC-DR 相关蛋白 CD74、组织因子途径抑制物 2、神经丝氨酸蛋白酶抑制剂在 mRNA 水平上都明显高于成纤维细胞, 荧光活化细胞分选系统分析也证实了两者在细胞表面上表达 MHC-DR 的差异。

流式细胞分析仪检测结果显示, BMSC 表面标记物 CD29、CD44、CD166、CD105 阳性, 而 CD45、

CD34、CD54、HLA-DR 为阴性。脂肪来源的 MSC (ADSCs) 表达 CD49, 而 BMSC 不表达; 脂肪 MSC 不表达 CD106, 而 BMSC 表达。脐带来源的 MSC 表达的标志物有 CD29、CD44、CD51、CD105、SH-2、SH-3, 不表达 CD34、CD45。胎盘来源的 MSC 表达 CD105、SH-2、SH-3 及 SH-4, 同时表达某些胚胎干细胞表面标志物, 如 SSEA-4、TRA-1-61 及 TRA-1-80 等, 不表达造血细胞、内皮细胞及滋养层细胞的特殊细胞标志物。

2006 年, 国际细胞治疗协会提出了关于 MSC 鉴定的最低标准, 包括以下 3 个方面的内容: ①在标准培养条件下能贴塑料瓶壁生长; ② 95% 以上的细胞表达 CD105、CD73、CD90, 同时 95% 以上的细胞不表达 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79 α 或 CD19、HLA-DR; ③能分化为骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞。

(三) MSC 的多组织来源

1. 骨髓 MSC 首先由 Friedenstein 在骨髓中发现, 后来人们对 MSC 的研究大部分都是针对来源于 BMSC 的研究。从骨髓提取的每 3.4×10^4 个细胞中就有 1 个 MSC, 其含量相对高于其他组织来源的 MSC。

使用骨髓作为 MSC 来源的不便之处有以下几个方面: 抽取骨髓的过程需要由高水平的专业人员来完成, 时间长达 20 ~ 30 分钟; 患者必须接受局部麻醉, 绝大部分患者在骨髓抽取过程中会感到疼痛, 超过三分之一的患者有长时期的中度到重度术后疼痛; 在一个位点可抽取的骨髓量通常不超过 2ml。BMSC 在临床应用之前需要先经过体外培养扩增。骨髓是 MSC 很好的来源, 但由于获取骨髓所要面临的实际操作问题及其伴发的疼痛并发症有可能限制其广泛的应用。

2. 脂肪 有大量研究表明脂肪组织是 MSC 的来源之一, 脂肪 MSC (ADSC) 可以从动物和人体内多种脂肪组织中获得。经过成骨条件培养的脂肪 MSC 仅有一小部分向成骨细胞分化, 大部分依然生成脂肪细胞, 说明脂肪 MSC 的临床应用时先将成骨细胞分离出来。

脂肪组织作为 MSC 的来源, 相对于骨髓作为 MSC 的来源有一定的优势。首先从实际操作角度来看, 脂肪组织的来源非常丰富, 比骨髓更易提取并且可提取量较大, 同时患者的疼痛较轻。有研究证实大鼠 ADSC 可以向成骨方向分化, 但 ADSC 与 BMSC 存在着一定的区别。当脂肪 MSC 与 BMSC 在

相同的培养条件下, 脂肪 MSC 没有和 BMSC 一样向成软骨和成肌方向分化; 在没有 $1, 25-(OH)_2$ -维生素 D₃ 存在时, BMSC 可以表达的骨钙素而脂肪 MSC 不表达骨钙素; 脂肪 MSC 和 BMSC 在某些表面标记物上也有着不同之处。因此, 从 ADSCs 获得的成骨细胞的生物学特性与 BMSC 来源的成骨细胞是不同的。

3. 骨膜 有研究发现骨膜外层细胞可以分化为成骨细胞, 来源于骨膜的 MSC 具有非常强的成骨能力。骨膜作为 MSC 的来源, 被用于骨膜组织移植和分离骨膜来源的 MSC。取自马胫骨的骨膜 MSC 在成骨培养条件下全部分化成了成骨细胞。兔骨膜 MSC 经体外扩增分化后植入颅骨缺损部位, 形成新骨能够修复缺损部位。取自人颅骨骨膜的骨形成细胞植入裸小鼠体内 6 周后, 新生成的组织骨钙素染色呈阳性。与 BMSC 和 ADSC 相比, 对骨膜 MSC 的研究相对较少。目前只观察到骨膜 MSC 向成骨细胞和成软骨细胞分化, 还没有向其他类型细胞分化的例子。分离骨膜同样会遇到与抽取骨髓类似的操作上的困难。但是由于 BMSC 的成骨能力很强, 在骨科学和组织工程中还有一定的应用价值。

4. 脐带血 分娩时获得的脐带血经常用于获取造血干细胞。Rosada 等从脐带血中培养出了 MSC。在成骨培养条件下, 脐带血来源的 MSC 可以表达碱性磷酸酶和骨钙素, 并形成了矿化的骨基质。与 BMSC 相比, 脐带血 MSC 在成骨培养条件下生长缓慢, 前体细胞数量较少, 骨相关抗原表达较低。当脐带血 MSC 植入小鼠皮下后, 形成大量基质样组织, 同时产生少量的骨组织。目前从脐血稳定获取 MSC 还有一定的难度。由于成人不能获得自体的脐带血 MSC, 临床应用的脐带血 MSC 会产生同种异体移植的问题。造血干细胞移植不需要相近的人白细胞抗原匹配, 脐带血 MSC 移植是否需要还有待进一步的研究。临床上利用脐带血 MSC 的不便之处主要是交叉配型和长期贮存。

5. 骨骼肌 仅存在于骨骼肌组织中的肌卫星细胞具有成肌、成骨和成脂肪的多向分化能力。Levey 等取健康成体的骨骼肌, 在成骨条件下培养肌卫星细胞, 发现超过 70% 的细胞可以表达碱性磷酸酶和骨钙素。和抽取骨髓一样, 获取骨骼肌也需要麻醉, 而且患者术后可能也会有几周的疼痛, 但相对来说, 采集骨骼肌更加方便。作为骨祖细胞的来源, 骨骼肌有一定的优势, 但是, 骨骼肌来源的 MSC 的成骨能力并没有骨髓、骨膜和脂肪组织来源的

MSC 强。

6. 成人外周血 有研究发现成人外周血也是 MSC 的来源之一。Zvaifler 等对来自健康成人的 100 多份外周血样本进行了分离,在所有样本的特定淘析层中均检测到了 MSC,淘析层中大概有 0.3%~0.7% 的细胞亚群含有 MSC,经分离的细胞在成骨条件下培养 20 天后,其中约三分之一表达了碱性磷酸酶、骨钙素及其他成骨细胞的表型,此项研究并没有提供外周血 MSC 在体内成骨分化的相关数据。Kuznetsov 等将从成人外周血获取的骨形成细胞与陶粉混合后植入免疫缺陷小鼠的体内,8 周后在植入部位形成了骨组织,用人 DNA 探针在新生骨组织中检测到了人来源的骨细胞。正常人体外周血中 MSC 的数量非常稀少, Li 等发现在长骨骨折患者与骨不连接患者的外周血中 MSC 的数量显著提高,与正常对照组比较,骨折患者外周血中的单个核细胞的 BMP-2 表达显著上升。Shirley 等证实在兔尺骨骨折模型中, BMSC 能够从远端骨髓部位经外周血循环募集到骨折断端。但是, Lazarus 等和 Wexler 等未能从正常人成人外周血中发现 MSC。可能是由于外周血中 MSC 数量稀少,不易被检测到;或者是因为所使用的培养技术不合适。

外周血作为 MSC 的来源有着非常明显的优点。因为采血是临床最常用的技术之一,这会使 MSC 疗法适用于几乎所有人群。目前面临的主要问题在于正常成人外周血中 MSC 的含量太少,还需要在外周血 MSC 的分离纯化,扩增和募集等方向作进一步的研究。

7. 其他来源 有研究报道牛血管周皮细胞植入无胸腺小鼠体内后,形成了包括骨组织等多种组织,在成骨分化培养条件下,血管周皮细胞来源的 MSC 可以表达大量成骨细胞标记物,包括骨钙素和骨涎蛋白。另外,取自视网膜血管的血管周皮细胞同样能够在体外向成骨细胞分化,血管周皮细胞来源的 MSC 并不适合于在人体上获取。

有研究发现妊娠 4~6 个月的羊水中含有比 VMSC 更具扩增潜力的 MSC,但由于交叉配型、长期贮存以及对胎儿的潜在风险等问题,羊水 MSC 的临床应用是十分有限的。有研究表明胎儿的血和肝也含有 MSC,但它们不会被临床应用。

有研究报道大鼠的脾脏是 MSC 的来源之一,虽然大鼠脾脏细胞并未在体内成功生成骨基质,但在成骨条件下,培养的脾细胞表达了骨钙素、碱性磷酸酶和骨涎蛋白。但是,脾脏作为 MSC 的来源,临床

应用也是很有限的。

另外,有研究表明真皮组织也含有 MSC,由于真皮取材相对方便,并且来源充足,有很好的临床应用前景,值得进一步的研究。

(四) MSC 的多向分化能力及其相关技术

MSC 来源于中胚层,具有向多种组织和细胞类型分化的潜能,有很强的可塑性。MSC 不仅可以定向诱导分化为各种中胚层组织细胞,还可以跨胚层分化,称为 MSC 的转分化或横向分化。MSC 能向成骨细胞、成脂肪细胞、成软骨细胞、成肌细胞、成神经细胞、成肌腱细胞、成纤维细胞等多种类型的细胞分化。

1. 成骨分化 大量实验证明, MSC 可以向成骨方向分化,将用地塞米松处理后的 BMSC 移植入体内,可观察到大量骨组织出现。Stefan 等将人胎盘 MSC 接种于绒毛膜支架后,置入含体积分数为 10% 胎牛血清、10mmol/L 地塞米松、10nmol/L $1, 25-(OH)_2$ -维生素 D_3 、50g/L 抗坏血酸和 10mmol/L β -甘油磷酸的高糖型 DMEM 培养液中,3~4 周后于电镜下观察到大块的细胞外壳覆盖于支架表面。通过检测碱性磷酸酶活性和 Ca^{2+} 浓度,显示证实胎盘来源的 MSC 能够分化为骨组织。MSC 参与体内骨重建在动物模型上已经获得充分的证据,在三维支架材料的辅助下,经过培养的 BMSC 在小鼠体内形成了高度血管化的原始骨组织。在进行用 BMSC 移植治疗大鼠右侧胫骨骨折的研究时发现,移植 MSC 3 天后在骨折部位开始出现移植的细胞并持续 14 天,用荧光素酶标记的 MSC 进行半定量分析发现移植的细胞覆盖了整个骨折部位,并且表达了骨形态发生蛋白-2(BMP-2)。

一个 MSC 分化为一个成骨细胞要经历四个主要阶段和五种主要的细胞类型。首 MSC 通过无限自我更新,产生未成熟的骨祖细胞,再经过有限自我更新,高度增殖产生成熟的骨祖细胞,再逐渐分化为前成骨细胞,最后有限增殖成为成熟的成骨细胞。

(1) 促进成骨方向分化的培养条件:促进 MSC 向成骨方向分化的培养条件如下所示,但不同研究人员使用的培养条件会略有不同。DMEM (dulbecco's modified eagle medium), 10% 胎牛血清, 0.01 μ mol/L $1, 25-(OH)_2$ -维生素 D_3 , 0.1 μ mol/L 地塞米松, 50 μ mol/L 抗坏血酸-2-磷酸盐, 10mmol/L β -甘油磷酸钠, 1% 抗生素。

(2) BMSC 成骨诱导的检测方法:①通过光学显微镜对液体培养基中的 BMSC 进行形态学特性观

察或采用扫描电镜对有载体依附的 BMSC 进行细胞和组织形态学观察;②通过 MTT 法测定细胞活性反映其增殖情况;③通过对 BMSC 进行 Gomori 钙钴法染色测定细胞内碱性磷酸酶含量和 Von-Kossa 染色测定钙结节,检测 BMSC 的成骨分化能力。

(3) 成骨分化的因子:成骨分化由多个因子控制。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)是成骨细胞发育的重要调节因子。对于较成熟的成骨细胞,BMP 能促进成骨细胞的分化和骨基质的形成,但是在成骨细胞发育的早期,BMP 抑制细胞分化,促进细胞增生。Runx2 也在成骨细胞的发育过程中起到了关键作用。在小鼠中,敲除 Runx2 基因将导致动物只有软骨细胞和软骨,而无成骨细胞与骨的骨骼系统。

(4) 成骨细胞的标记物:有许多标记物可以用来识别 MSC,成骨细胞有更加特定的标记物。①表面标记物:未成熟的骨祖细胞有大量可被检测到的表面标记物,与这些表面标记物对应的抗体包括:Stro-1、SH-2、SH-3、SH-4、SB10 及 HOP-26,这些表面标记物也能在 MSC 中检测到。因此,这些抗体不能用来确证定向骨祖细胞的存在,但可用来识别那些具有向成骨细胞分化潜能的 MSC;②细胞与分子标记:碱性磷酸酶的骨、肾、肝同形异构体的表达可见于成熟的骨祖细胞,前成骨细胞及成熟的成骨细胞等这些在成骨分化链中较为成熟的细胞,MSC 或不成熟的骨祖细胞不表达碱性磷酸酶,碱性磷酸酶的表达随分化而增强。I 型胶原除不成熟的骨祖细胞之外在所有细胞中都有表达。尽管 MSC 并不表达 I 型胶原,但由 MSC 分化而来的非成骨细胞却可表达 I 型胶原,所以 I 型胶原不是一个成骨细胞鉴定的决定性指标。骨钙素在成熟的成骨细胞中表达,但表达量有较大差异,而且并不是所有的成熟成骨细胞都可以表达,因此骨钙素可以作为成骨细胞的一个定性检测指标,但还不能用于定量检测。成骨分化链上各分化阶段的细胞,包括前成骨细胞和成骨细胞都表达骨涎蛋白,但同样存在表达量的问题。成骨细胞分泌的矿化基质含有磷酸钙,可用茜草红检测。

2. 成软骨分化 随着培养扩增过程中传代次数的增加,BMSC 的增殖能力和向成骨细胞和脂肪细胞分化的潜能不断降低,而向软骨细胞分化的潜能却几乎没什么改变。大量研究显示,含地塞米松、抗坏血酸、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸及 $10\mu\text{g/L}$ TGF- β 的基础培养液最适合于诱导 MSC 向软骨方

向分化。丝裂原活化蛋白激酶信号通路和 Smads 信号通路等一些胞内信号通路被激活后,诱导特异的转录因子 Sox9、Sox5、Sox6,导致 II 型胶原、蛋白聚糖和软骨低聚基质蛋白等胞外基质蛋白的分泌,其中 Sox9 在 MSC 向软骨细胞分化的过程中发挥了关键作用。Zheng 等将 BMSC 封装入胶原蛋白水凝胶囊内,再放入由超高相对分子质量聚乙烯制成的扩散盒中,将该扩散盒植入兔背部皮下,8 周后观察到扩散盒内软骨细胞均匀分布,并具有软骨特有的细胞外基质和 II 型胶原产生,因此可以认为胶原蛋白水凝胶在体内聚集 TGF- β 等信号分子诱导软骨形成。

3. 成脂肪分化 1999 年 Pittenger 等用地塞米松、胰岛素、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤和吡啶美辛诱导 MSC 分化为脂肪细胞,分化的细胞内有脂滴聚集,并表达过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_2 ,脂蛋白脂酶和脂肪酸结合蛋白 αP_2 ,细胞内的脂质小泡持续增加直至充满细胞,这些物质可被油红染成红色,表明 MSC 可以向脂肪细胞分化。常用的体外成脂肪诱导培养液成分为:含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 1.0×10^{-9} mol/L 胰岛素和 1.0×10^{-7} mol/L 地塞米松。在 MSC 的成骨和成脂肪分化中,在基础诱导液中间歇加入 PTH 可抑制 MSC 向成脂肪细胞分化。MSC 能同时表达雌激素受体 α 和 β ,在未诱导情况下,MSC 雌激素受体 α 表达占优势,在成脂肪分化中则表达减低,而雌激素受体 β 增加,表明雌激素受体 α 和 β 在 MSC 的成脂分化中发挥关键的调节作用。由于 MSC 具有内在的成骨和成脂肪分化潜能,两者之间可以产生转分化。随着年龄增长,骨髓中的脂肪细胞数量增加,成骨细胞减少。来源于绝经后骨质疏松妇女的 MSC 成骨分化能力减弱,更易于向脂肪细胞分化。皮肤和脂肪来源的 MSC 都能向成骨细胞和成脂肪细胞分化。通过诱导抑制 MSC 向脂肪细胞分化,同时促进其向成骨细胞分化,开创了 MSC 在治疗骨质疏松及其他成骨障碍性疾病的崭新的临床应用前景。

4. 成肌肉分化 MSC 在特定条件下可以分化为心肌细胞并分泌血管源性细胞生长因子。1995 年 Wakitani 等用 5-氮胞苷和两性霉素 B 诱导 MSC 分化成为可以节律跳动的肌小管。Tomita 等用 5-氮胞苷处理成年小鼠的 BMSC 后,移植到心肌冻伤鼠模型的心肌瘢痕组织中,观察到 MSC 分化为心肌细胞,并表达了心肌特异性肌钙蛋白 1,同时伴随有血管的形成,心脏功能得到了改善。日本研究者将同种异体 MSC 移植到大鼠心肌梗死区域后,发现在梗

死区和非梗死区交界处的心肌的纤维化明显减少,左心室舒张内径增大,左心室射血分数得到了显著改善。

5. 成肌腱分化 有研究报道 MSC 可以被诱导生成肌腱组织。Sahoo 等将 BMSC 种植于混合生物支架材料后,可以获得类似于肌腱组织的光滑纤维。他们用 qRT-PCR 分析得出,在复合材料移植后第 1 天时,就有 I 型和 III 型胶原蛋白表达,第 14 天时可以达到较高水平,3 周时可以生成较多的胶原蛋白(39%)。Sahoo 等还将 BMSC 复合生物支架移植到大鼠跟腱缺损处,结果发现在移植 4 天后缺损处出现较多的成纤维细胞,通过电镜观察,这些细胞在支架轴向上紧密的排列。组织学观察到术后 4 周时,在损伤部位出现新的类似于自体正常结构的肌腱组织,这些新生的肌腱组织在生物力学测试中也得到了良好的效果。

6. 成神经分化 Kopen 等将骨髓基质细胞注入新生小鼠的前脑和小脑内,结果分化成星形胶质细胞。2000 年 Woodbury 等用 β -巯基乙醇,硫代甘油,叔丁基对甲氧酚等分别导入人和大鼠 MSC 分化为神经元样细胞和神经胶质细胞,同时表达神经元特异性烯醇酶,神经元核抗原和神经微丝-M 等神经细胞标志物。Ni 等将 SD 大鼠的间充质干细胞与嗅鞘细胞共培养,显示分化的细胞表达神经元特异性烯醇化酶、 β 微管蛋白 III、微管相关蛋白 2、神经胶质原纤维酸性蛋白等神经细胞标志物。少突胶质细胞和施万细胞的转分化也已有报道。目前已经有临床试验用 MSC 转分化的神经细胞治疗肌萎缩性侧索硬化症和多发性硬化症。在动物模型中只有少数细胞因子和化学因子能有效促进间充质干细胞神经样细胞的分化。

7. 向胰岛样细胞分化 2004 年 Chen 等将 Wistar 大鼠 MSC 置入含 10mmol/L 烟碱,1mmol/L β -巯基乙醇,20% 胎牛血清的低糖型 DMEM 培养液 24 小时,再置入含相同浓度的烟碱和 β -巯基乙醇的无血清高糖型 DMEM 培养液 10 小时,观察到成簇分布的胰岛样细胞,处理后的 MSC 细胞中含有胰岛素和巢蛋白,将由 MSC 分化的胰岛样细胞注射入糖尿病大鼠体内,可以下调其葡萄糖水平。

8. 向上皮细胞分化 有研究表明,MSC 可以分化为表皮角质细胞、皮脂腺细胞和皮脂腺。方利君等从静脉输注骨髓单个核细胞或与造血干细胞混合输注后,发现在上皮组织中有 BMSC 分化来的上皮细胞。在小型香猪背部皮肤创伤模型中,从局部注

入 5-溴-2-脱氧尿苷标记的 BMSC,发现有少量的表皮层内呈现 BrdU 和细胞角蛋白染色阳性。

9. 向肝脏细胞分化 有研究报道 MSC 可以在体内或体外分化成为肝细胞。将绒毛板 MSC 移植到四氯化碳损伤肝脏的模型后,发现 α -平滑肌纤维蛋白和 I 型胶原蛋白表达的水平下降,而白蛋白和 MMP-9 的表达水平增高。Abdel Aziz 等用雄鼠的 BMSC 通过鼠尾静脉移植到四氯化碳损伤的雌鼠体内,用 SRY-PCR 测量雄鼠 BMSC 在雌鼠体内吸收,发现移植的 BMSC 可以降低肝脏内胶原蛋白的生成,发挥了一定的抗肝纤维化作用,表明 BMSC 移植对肝损伤是一种有效的治疗方法。

二、MSC 在骨科中的应用

临床中对于许多骨科疾病,如骨损伤、软骨损伤、肌腱损伤等的治疗,传统的方法是自体组织移植和采用药物治疗、暂时性替代疗法等。虽然可以得到满意疗效,但因为自体取材带来的并发症和附加损伤,以及免疫排斥反应需长期使用免疫抑制剂,因此并不是理想的治疗手段。MSC 是干细胞家族中的重要成员,近年来已成为干细胞领域的研究热点。其不仅支持造血系统和促进干细胞植入,而且具有多向分化潜能,除了可以分化为相同胚层来源的组织细胞,还可向中胚层和外胚层来源的组织分化,在特定的诱导条件下分化成为骨、软骨、脂肪、肌肉、肌腱、韧带、神经以及内皮等组织细胞。MSC 具有在体外抑制淋巴细胞增殖、在体内延长皮肤移植物存活的独特的免疫学特性,具有长期存活于异基因环境中的优势,同时 MSC 具有自我更新的能力。近年来移植方面的研究表明,MSC 植入不仅具有阻止免疫排斥发生的能力,同时具有免疫调节效应。因此,MSC 作为临床治疗的一种手段成为可能。在近几年较为前沿的组织工程骨、软骨、皮肤以及神经血管的研究中,MSC 发挥了巨大的作用。

骨髓是临床应用时最常见的间充质干细胞的来源,骨髓间充质干细胞(BMSC)指的是骨髓基质系统中所含有的一类多能干细胞,它不表达造血干细胞的相关标志,具有多向分化的能力。随着 BMSC 研究的不断深入,干细胞应用于临床治疗骨科疾病成为可能。BMSC 具有以下优点:①来源广泛,可取自体;②取材简便,可由髂骨直接穿刺获得;③纯化后可体外低温保存,生物学性能无明显改变;④自体 BMSC 移植无免疫排斥反应。许多学者认为 BMSC 可以为组织重塑和功能修复提供细胞来源,是

目前最有希望在临床广泛使用的组织工程种子细胞。

BMSC 在临床上的应用非常广泛,包括骨科系统疾病的修复,肝脏、心血管、神经系统疾病的治疗,并在皮肤和整形外科等方面有应用。本节着重论述 BMSC 在骨科的应用。骨骼肌肉系统修复需要细胞,细胞外基质/支架,信号分子以及血供等必要条件,对于骨骼肌肉系统疾患创伤的治疗也是围绕这几个环节进行。目前在骨科领域 BMSC 的应用研究主要分为 BMSC 本身作为治疗手段的细胞治疗和以 BMSC 为载体传递信号分子的基因治疗,而组织工程则是将这两者与生物工程材料相结合。

(一) BMSC 与骨组织的修复

1. BMSC 在骨缺损与骨不连中的应用 治疗骨缺损的传统方法是自体组织移植术,虽然疗效较为满意,但牺牲自体健康组织会导致很多并发症及附加损伤,应用组织工程学方法复合 BMSC 与支架材料来治疗骨缺损即克服了上述方法的不足。骨髓中 BMSC 含量极少且随年龄增长而成几何级数下降,因此利用 BMSC 的自我扩增能力在体外大量扩增后再用于治疗就成为一种理想的方法。Bruder 等利用体外扩增的 BMSC 结合多孔生物陶瓷移植,成功地修复了狗股骨节段性缺损。Pittenger 等在犬和人来源 BMSC 的培养体系中加入地塞米松、 β 磷酸甘油和抗坏血酸联合诱导, BMSC 逐渐聚集,同时,碱性磷酸酶活性也随之增高,基质钙化明显,显示 BMSC 可分化为成骨细胞。Gronthos 等将人来源 BMSC 体外扩增后与羟基磷灰石/磷酸三钙载体复合,再植入裸鼠背部皮下,发现载体周围有骨髓和新骨组织形成,且原位杂交显示新骨组织中的骨细胞为来源。Ouyang 等将 BMSC 与去除矿物质的骨片结合移植到人骨缺损部位,组织形态学观察显示,3 周后移植物的结构与正常骨膜相似,并向成骨、软骨分化。Kon 等报告,将自体 BMSC 接种在多孔羟基磷灰石陶瓷载体上,植入绵羊体内修复长骨缺损,2 个月后试验组胫骨截断处的植入物形成骨量显著增多,且力学强度远高于对照组。Arinze 等也在体外利用 BMSC 建出有活性的人工骨,并成功地修复了儿童的股骨缺损。Song 等发现将地塞米松处理过的 BMSC 移植入体内出现大量的骨样组织。Granero 等用 BMSC 移植治疗大鼠右侧胫骨骨折,骨折部位在移植后 3 天开始出现移植的 BMSC,并可持续 14 天。半定量分析用乙光素酶标记的 MSC,发现其覆盖了整个骨折部位,且表达成骨重要因子 BMP-2。

这些研究证明 BMSC 扩增后再植入的方法是可行的,且其复合适宜的材料移植可修复骨缺损。

脊椎后外侧融合是治疗脊椎损伤的一种良好方法。Chen 等用共聚微孔复合 MSC (PKH-67 标记) 及聚丙烯醇与环氧乙烷共聚物 F-127 在兔脊椎移植进行融合实验,结果发现 MSC 黏附于复合孔表面及孔内并且向成骨样分化。原位跟踪 PKH-67 标记的 MSC 显示移植的 MSC 可以部分的生成新骨。X 线及 CT 结果显示在移植后有持续的骨样物质形成,横断面扫描提示有脊椎融合。

还有一些研究针对体外扩增的 BMSC 进行基因转染,使其高效、有序地分化为特定的组织来用于修复损伤。Riew 等报道了体外转染 BMP-2 的 BMSC 可以促进猪的椎体间融合。Lou 等将 BMP-2 基因通过腺病毒转染 BMSC,使其在体外定向分化为骨,并注入裸鼠肌肉,证实可以发育成具有骨小梁、骨髓和软骨组织的骨。有研究表明在裸小鼠身上肌内注射腺病毒介导的人 BMP-2 基因能促进局部 BMSC 的增殖和分化,且一部分移植的细胞自身具有自分泌和旁分泌的特性。BMSC 修复骨缺损可能通过使用特定的细胞活素类比如 IGF, PDGF 和 FGF 得以改善。现在的基因治疗研究还停留在单一因子对骨的修复,并且一种细胞因子既可以诱导 BMSC 分化为骨,也可以诱导其分化为软骨,修复哪方面的缺损,可能与 BMSC 所处的微环境有关。

近年来,很多中外学者和骨科医生曾用自体红骨髓复合其他材料植入实验动物的骨缺损处,或用于临床以期加速骨折愈合和骨缺损早期修复,并取得了一定的成效。Kadiyala 等分别用磷酸三钙圆柱体加同源大鼠的 BMSC,圆柱体加新鲜骨髓,圆柱体加多孔羟基磷灰石填充大鼠股骨干 8mm 骨缺损区,结果显示,植入复合 BMSC 的样本生成骨基质最多。陆等通过实验证实用冻干松质骨做为 BMSC 的载体在体内成骨作用要优于羟基磷灰石。Petite 等比较了珊瑚支架复合 BMSC、珊瑚支架复合红骨髓,以及单独使用珊瑚支架来修复羊大段骨缺损模型,观察到 BMSC 组临床愈合率明显高于其他组。Quarto 等报道采用自体髂骨穿刺抽取骨髓,分离培养 BMSC 并体外扩增后,复合羟基磷灰石植入 3 例四肢长骨缺损病例,并采用支架固定,均获得功能恢复。Maccacci 等报道将自体 BMSC 扩增后复合于大孔羟基磷灰石生物陶瓷支架,可成功治疗不同程度骨折缺损的患者:分别为胫骨骨折 1 例,肱骨干骨折 1 例,尺骨骨折 2 例,缺损范围从 3.0 ~ 28.3 cm³ 不等。经

术后六七年的随访,植入物在患者体内呈现出很好的整合效果。Connolly 等将患者的骨髓吸取物直接注射在胫骨骨不连处,6 个月后 20 例骨不连患者中有 18 例成功治愈。Hernigou 等经皮注射富含浓聚 BMSC 的骨髓移植治疗 60 例胫骨骨不连患者,其中 53 例获得成功。未治愈的 7 例患者所接受的骨髓移植中 BMSC 平均浓度低于 $1000 \text{ 个}/\text{cm}^3$,所含总量低于 30 000。平均浓度及所含细胞总量均低于成功病例。但可以达到骨修复的 BMSC 的最佳浓度还有待于进一步的探究。

以上试验说明 BMSC 在修复骨缺损方面确实起到了积极的作用,且将其用于骨组织工程治疗骨缺损更具优越性,有利于临床应用。目前应用组织工程技术和生物工程技术,在体外用 BMSC 已构建出有活性的人工骨,且构建的组织工程化骨也已成功地修复股骨的骨缺损和牙槽骨骨缺损。而且还有人以患者自体 BMSC 为种子细胞构建组织工程化骨修复颅骨、四肢骨、牙槽骨骨缺损以及颅面部骨凹陷所致的畸形,取得了满意的疗效。随访结果表明,组织工程化骨可在患者骨缺损内长期稳定存在,基本上恢复了患区的支持和保护等功能。

2. BMSC 在成骨不全中的应用 因 BMSC 具有多向分化潜能,原则上,BMSC 可以降低或者改变遗传性的成骨不全。Chamberlain 等报道了体外扩增基因修饰的患者自体 BMSC 来治疗由 I 型胶原基因 (COL1A1) 突变导致的成骨不全。临床上,Horwitz 等使用同种异体骨髓治疗 3 例成骨不全的小孩,在植入骨髓 3 个月后,骨样本组织学提示新的密致骨形成,患者全身骨矿物质含量较正常健康小孩明显增加,骨小梁发生了明显的组织变化,骨的生长速度加快,同时降低了骨折的发生频率。他们认为同种异体骨髓可以引导功能性 BMSC 植入,促进新骨形成,提示 BMSC 治疗成骨不全的可行性。该研究还证明移植骨髓中所含的 BMSC 可以迁徙至患者骨骼成骨。然而由于缺乏对照和仅 6 个月的临床随访使得该研究备受争议。该研究团队还进一步研究深入了解这些移植细胞的生物转运特点,他们使用野生型 I 型胶原基因标志的供者 BMSC 治疗 6 例严重的成骨不全患者,经 6 个月的治疗,5 例患者显示有明显的供体 BMSC 迁徙至多个部位,包括骨、皮肤和骨髓。在首次治疗 6 个月后,该 5 例患者骨生长速度显著提高,达同年龄和同性别正常人的 60%~94%。

3. BMSC 在骨坏死疾病中的应用 股骨头坏死 (ONFH) 是一种严重危害人类健康、致残率极高的

常见病,常累及中青年,呈进展性和致残性发展,有较长静默期,但一旦发生症状,病情发展迅速。ONFH 发病机制复杂多样,病因主要是创伤、应用激素、酗酒及结缔组织病变等。微循环障碍是原发性股骨头坏死的共同病理机制。其特征是股骨头缺血、坏死,随之出现修复反应,进而发生股骨头塌陷及髋关节退行性关节炎。而由于 BMSC 具有良好的多向分化潜能、活跃的增殖特性、对外源基因的高效转染表达能力以及促进造血等特性,较多地用于股骨头坏死的研究,显示了良好的应用前景。1997 年,Hernigou 首次报道用自体骨髓细胞植入镰状细胞病患者的股骨头坏死区,取得了良好疗效。也是 Hernigou 首先发现在骨坏死患者体内,BMSC 活力降低,增殖受抑,不能提供充足的成骨细胞以满足早期骨坏死重塑修复病损的需要。并提出骨坏死可能也是一种成骨细胞或间质细胞性疾病,在坏死区植入 BMSC 或含有 BMSC 的正常骨髓细胞有助于骨坏死区的修复重塑。随后,Gangji 等也证实股骨头坏死患者骨坏死区附近的成骨细胞的塑形能力明显下降。Kocher 等通过实验证实 BMSC 或内皮前体细胞可以促进缺血模型的血流恢复。Kinnaird 等在给鼠缺血性后肢肌内注射体外培养的 BMSC 后发现其可以促进侧支循环及肢体功能恢复,并且血管生成相关因子,如 VEGF、FGF-2、IL-6 等基因表达水平增高。可见通过 BMSC 移植既有利于股骨头血液供应的恢复,又能提高局部成骨能力,从而促进坏死骨的修复。目前 BMSC 多与其他疗法联合应用。

(1) 髓芯减压 BMSC 移植:Hernigou 用髓芯减压加植入自体骨髓细胞的方法治疗了 189 例早期股骨头坏死患者,通过 5~10 年的随访,证实植入自体骨髓细胞比单纯髓芯减压更有利于早期骨坏死的修复。Gangji 也报道类似的临床实验结果,对 18 例 ARCO I~II 期的股骨头坏死患者进行了为期两年半的研究发现,髓芯减压加植入自体骨髓单核细胞组的疗效明显好于单纯髓芯减压组,并提示骨髓单核细胞及 BMSC 可能对早期骨坏死有修复和重塑作用。这些研究为 BMSC 进一步临床应用于骨坏死疾病提供了宝贵的依据,但由于目前病例数较少,且随访期较短,仍有待于进一步探索。

(2) BMSC 介入移植:Labianca 等采用介入方法将 BMSC 植入 5 例股骨头坏死患者的侧旋股内外动脉及闭孔动脉内。1 年随访结果显示,患者临床症状明显缓解,髋关节临床症状 Harris 评分显著提高,髋关节活动度无明显改变,未发生严重并发症。

介入移植 BMSC 治疗股骨头坏死是一种安全有效便捷的方法,还可以免除开放性手术的痛苦,为治疗早期股骨头坏死开辟了新的思路。

(3) 基因转染 BMSC 移植: Xiao 等用 rhBMP-2 基因转染 BMSC 种植的支架材料,在组织学上有正常骨修复,提示 BMP-2 基因转染的 BMSC 是治疗股骨头坏死的有效途径。

(4) 联合填充材料 BMSC 移植: 在联合载体的选择上,有使用聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物 (PLGA) 作为体内研究的支架材料,也有使用填充纳米人工骨和 BMSC 的复合材料,还有使用牛松质骨、自身松质骨等方面的相关研究。但寻求组织相容性高,副作用少,便捷有效的材料依然值得进一步探索。

4. BMSC 在椎间盘退行性疾病的应用 颈腰痛是骨科的一种常见病、多发病,引起这些病症的一个重要因素是椎间盘退变。传统的治疗方法包括保守治疗和手术治疗,虽然可在一定程度上缓解临床症状,但不能解决根本问题,还会产生相应的并发症,如术后腰痛、神经损伤、脊柱活动受限等。理想的外科治疗方法是修复退变的椎间盘,而干细胞技术的兴起及其在临床不同领域的应用,为椎间盘退变疾病的治疗带来了新的思路。Sakai 等报道了 BMSC 移植修复兔椎间盘退变模型的实验。将 BMSC 复合于 Atelocollagen 支架上,在髓核退变模型建立后的第 2 周植入,8 周后观察椎间盘的组织学表现并检测髓核蛋白多糖含量。初步结果显示,椎间盘经过 BMSC 移植后退变减缓,功能改善。Crevensten 以透明质凝胶为载体,将 BMSC 注入鼠椎间盘退变模型,28 天后观察到注入的 BMSC 均成活,且 BMSC 在椎间盘中依然保持着很强的成活力和增殖力。Sakai 将荧光标记的 BMSC 植入兔椎间盘退变模型,2 周后观察到部分 BMSC 分化为髓核细胞,48 周后细胞数目较空白对照组显著增加,这表明 BMSC 能分化为椎间盘的组织细胞,修复退变的椎间盘组织。Sato 等将自体 BMSC 移植到兔退变椎间盘,24 周后,实验组退变椎间盘的高度恢复了 91%,MRI 信号强度恢复了 81%,假手术组则分别为 67% 和 60%。组织学检测表明,BMSC 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结构却辨识不清。免疫组织化学及基因表达分析表明,实验组椎间盘中蛋白聚糖的积聚得到恢复。这充分说明 BMSC 可有效地诱导退变椎间盘再生。

目前有关移植方面的研究还都停留在动物实验

阶段,主要是自体移植或者同种异体移植,依靠局部环境诱导 BMSC 分化为能够分泌蛋白多糖和 II 型胶原等细胞基质、具有椎间盘细胞功能的细胞,从而修复退变的椎间盘。

(二) BMSC 与软骨组织的修复

人体关节软骨无血液供应且由于关节软骨细胞缺乏增殖分化能力而使软骨组织内在修复能力极弱,因而关节软骨缺损的修复一直是临床上急需解决的难题。BMSC 的出现和组织工程的发展使人们看到了完美修复关节软骨损伤的希望。

1. 体外培养扩增 BMSC 修复关节软骨缺损 Wakitani 等最先报道了体外扩增兔骨髓和骨膜中分离出 BMSC,与 I 型胶原凝胶混合后移植入兔股骨内髌关节软骨缺损处。术后 2 周缺损处的 BMSC 已分化成软骨细胞,4 周时缺损深处有骨形成,12 周时软骨下骨已修复良好且上层的新生软骨组织依然保留生物学活性。力学检测显示,术后 24 周的修复组织硬度比空白对照组强而稍弱于正常软骨。Kraus 等采用放射自显影方法证实当关节软骨损伤波及软骨下骨时,修复组织主要来源于 BMSC,而非损伤周围的软骨细胞。Johnstone 观察到 BMSC 能在一种采用透明质酸和明胶合成的高孔率的坚固基质材料中进行全面的软骨分化。

Robinson 等将成年兔 BMSC 在体外扩增,并使用生物材料作为载体修复软骨损伤,种植后 6 个月通过生物化学,组织学和生物力学检测发现形成了典型的透明软骨。Caplan 等在兔的膝部股骨髌上构建了一个全层的软骨损伤模型,在支持载体上种植适当数目的关节软骨细胞或自身 BMSC,能够重新合成关节软骨并修复损伤。Noth 等进行了体外工程化软骨的构建,发现种植于聚乳酸 (PLA) 块表面的 BMSC,能够分化形成分层排列的软骨样细胞,并且合成含有 II 型胶原和软骨蛋白多糖交联蛋白的类透明软骨样细胞外基质。Yoshioka 等在实验研究中发现,在软骨损伤部位移植 BMSC 和支架复合物后,4 周出现白色的软骨样组织,26 周时透明样软骨组织覆盖整个缺损部位,而软骨下骨和骨髓同样也得到了修复。Planka 等在构建了兔股骨远端损伤模型,移植 BMSC 和支架复合物后 4 个月,移植组较对照组在损伤后骨生长的长度以及外翻畸形的纠正上有显著性差异。Diduch 等研究比较了 BMSC 与不同材料的结合情况,发现在琼脂糖中培养的 BMSC 产生 II 型胶原以及聚集蛋白聚糖的速度最快,海藻酸盐其次。BMSC-胶原凝胶复合物随培养时间延长

会发生体积回缩,而 BMSC-海藻酸盐复合物长期培养体积不会发生明显变化,且动物实验进一步证实,该复合物能有效地修复软骨缺损。Im 等模拟自体软骨细胞移植的方法,将从兔骨髓分离出的 BMSC 体外培养扩增后,以一定的密度悬液注射到兔髌骨滑车的骨软骨缺损处,表面以股四头肌筋膜覆盖。术后 14 周,修复组织经免疫组化和 rt-PCR 等方法证实为软骨组织,且组织学评分远高于对照组。

2. 体外诱导分化 BMSC 修复关节软骨缺损 Miriam 等将以高密度培养 BMSC 诱导软骨细胞表型后掺入 2% 的高相对分子质量透明质酸进行自体移植修复羊膝关节软骨缺损,3 个月后形成了组织结构与正常关节软骨相似的透明软骨。Yang 等研究用体外扩增且诱导分化的 BMSC 复合海藻酸盐载体材料移植于关节软骨损伤区,术后 6 周时,实验组软骨损伤区即由类似透明软骨样修复组织填充,该组织内细胞形态类似于透明软骨细胞,且细胞周围有软骨陷窝形成。原位杂交实验证实细胞表达 II 型胶原 mRNA。透射电镜观察到细胞周围有胶原纤维的产生,免疫组织化学结果显示其为 II 型胶原纤维,证实修复组织为透明软骨。Xu 等证明用诱导分化的自体 BMSC 复合明胶海绵载体修复兔自体股骨髌关节软骨缺损,相比单纯明胶海绵载体对照组,能促进软骨缺损的快速修复,恢复关节软骨的结构和功能。

3. 基因工程技术转染 BMSC 修复关节软骨缺损 目前,用基因工程方法治疗关节软骨损伤的研究已取得较快进展,为关节软骨缺损的治疗开辟了新的途径。BMSC 不仅具有多向分化潜能,还易于外源基因的转染和表达。将 β 半乳糖苷酶基因和新霉素抗性基因导入 BMSC,在植入后的受体骨和软骨组织内检测到了这些基因产物的表达,提示 BMSC 携带外源基因在体内可以表达正常产物。还有报道,BMSC 携带的外源基因表达具有组织特异性,受所定位微环境的作用,这些都为 BMSC 应用于基因治疗提供了依据。因此,骨髓 BMSC 可能成为一种新型的基因治疗的靶细胞,通过导入目的基因,将细胞治疗和基因治疗结合起来,对人类疾病的治疗将具有更广阔的前景。

Mason 等以逆转录病毒为载体在体外将 BMP-7 基因转染兔 BMSC,扩增培养后与生物材料聚乙醇酸一起植入兔关节软骨缺损,8 周后发现缺损表面有软骨组织覆盖,经检测证实为透明软骨,并发现受

损的软骨下骨结构也修复良好。由此说明,基因工程技术转染 BMSC 能够同时修复关节软骨和软骨下骨缺损。Doherty 等发现,转基因的软骨细胞可以黏附于关节软骨的表面存活,并表达出相应的功能基因产物。Goomer 等证明,将 TGF- β_1 基因转染软骨细胞并注射入动物关节腔内,可大大提高软骨细胞外基质中蛋白多糖和 II 型胶原的含量,并可减少软骨细胞凋亡的数量及比例。Nixon 等将转染了 IGF-1 基因的软骨细胞注射入动物的关节内,发现软骨细胞能高效表达 IGF-1,且表达时间至少可维持 4 周。Fernande 将重组有 IL-1Ra 基因的质粒 VR1012 直接注入兔膝关节腔内,发现存在功能基因的表达,且表达至少可维持 4 周。这些研究都证明了基因治疗技术与组织工程学相结合治疗软骨损伤具有良好前景。

4. BMSC 修复关节软骨缺损的临床应用 在临床应用研究中,BMSC 的修复效果并不令人满意。Wakitani 等用自体 BMSC 修复骨性关节炎患者膝关节软骨缺损,术后活检发现组织学上相对于对照组有改善,植入的 BMSC 在部分区域形成了透明软骨样组织,组织学及关节镜评分均优于无细胞移植的对照组,但临床症状并没有显著改善。这类研究中的新生软骨组织结构均与正常软骨组织有差异,机械性能等特性也不及正常软骨。软骨损伤的完全修复需要植入的 BMSC 完全分化为成熟的软骨细胞,并且新生软骨要与周围软骨组织完全融合,但目前的研究尚不能达到这一点。有观点认为关节软骨形成和成熟是在机体的胎儿和幼年时期,成年个体中控制软骨发育成熟的内环境已经消失,因此仅仅提供修复的细胞是不够的,以 BMSC 为基础的细胞治疗和相关分化调控因子的基因治疗的综合可能是解决软骨缺损修复的最终途径。

5. BMSC 修复半月板损伤 和关节软骨损伤的修复一样,半月板损伤的自身修复能力也很差,以往的治疗往往以镜下切除或修整损伤半月板的关节为主要治疗手段,BMSC 的发现也使损伤半月板在功能和形态上的恢复成为可能。Xu 等以胶原-糖胺聚糖模板为载体,将经体外扩增及细胞因子刺激后已进入软骨细胞分化谱系的 MSC 回植入体内,术后 3~24 周连续对重建半月板组织进行大体、组织学及电镜观察。结果显示,胶原-糖胺聚糖模板逐渐被降解吸收,而 MSC 可逐渐合成分泌新生胶原,经不断改建最终形成半月板样纤维软骨组织。一旦在不

久的将来损伤的关节软骨和半月板能达到功能和形态上的恢复,则不仅有利于创伤引起的关节软骨和半月板损伤的治疗,而且对于发病率越来越高的关节退变患者的治疗也将翻开崭新的一页,为提高老年人的生活质量作出不可估量的贡献。

(三) BMSC 与肌肉组织的修复

随着人们生活节奏的加快,严重的软组织损伤的患者也越来越多,在临床上的处理方法并不是很多,最有效的就是一些自身的移植,但这不仅会造成供区的损伤,而且其应用也会受到数量的限制,给治疗带来很大的局限性。BMSC 的研究证实它可以向肌肉组织细胞分化,Giuliana 等将 BMSC 经静脉系统注入到一侧腓肠肌损伤的动物体内,一段时间后,移植的 BMSC 可以迁移至受损的腓肠肌组织中而分化成肌细胞,起到了修复损伤的作用,而另一侧腓肠肌中则没有 BMSC 的出现。这一研究若能应用于临床,则不仅解除了供区的损伤,而且解决了数量不足的难题。除了骨骼肌的修复,BMSC 在心肌细胞的损伤修复中也发挥作用。有研究显示,将干细胞和心肌细胞混合培养或者将干细胞置于加有心肌细胞提取物的环境中培养也是将干细胞转化为心肌细胞的途径之一。Chedrawy 等将 BMSC 细胞标记后,注入大鼠心肌,结果显示:第 1 周标记的细胞仍保持未分化状态,4~6 周以后,移植细胞分化完全,其结构与正常心肌极相似,同时移植细胞的肌纤维方向与宿主心肌纤维平行。Tang 等将 BMSC 移植到大鼠左冠状动脉下支结扎心肌缺血模型中,发现在瘢痕区有大量的新生血管出现,8 周时观察到左心室血流增加,移植 2 个月 after 在移植区的心肌细胞凋亡明显较对照组少,心功能有明显改善。还有学者用激光心血重建术和 BMSC 联合治疗心肌缺血取得了有效的成果。这些对于心肌损伤的修复的研究虽然并不能直接运用于骨骼肌,但对于 BMSC 对骨骼肌的修复研究有一定的指导意义。

(四) BMSC 与肌腱韧带组织的修复

肌腱的损伤是临床常见疾病,目前治疗方法主要采用自体肌腱移植,自体肌腱转移修复等,但由于取材有限,容易增加新的创伤,故在临床应用中受限。而异体肌腱移植又容易发生免疫排斥反应,因此探寻一种新的治疗方法成为肌腱修复的一项重要任务。近年来研究显示 BMSC 除了可向骨、软骨组织分化外,还可向肌腱组织细胞分化。与 BMSC 的

成骨和成软骨分化比起来,对于其向肌腱细胞分化的机制了解甚少,推测可能与培养条件、生长因子、物理环境如机械刺激等有关。与骨修复、软骨修复一样,完全的肌腱和韧带的修复可能需要细胞治疗、基因治疗和力学刺激的综合应用。Wolfman 在动物模型中发现转化生长因子(GDF)5、6、7 参与诱导与韧带样或肌腱样组织形成。

胶原蛋白在组织的连接中起到很大的作用,其中 I 型胶原蛋白是最丰富的,并且在肌腱和骨组织结构塑性方面起到至关重要的作用。胶原纤维复合 BMSC 后能够完成肌腱缺损修复,被修复肌腱较单纯胶原纤维修复的更粗、胶原纤维束更成熟、生物力学性能也更优越。Young 等利用培养的自体 BMSC 结合 I 型胶原修复兔跟腱缺损,他们将 BMSC 悬浮于胶原凝胶的载体上,在兔的两根跟腱上分别做 1cm 长的断口损伤模型,然后把细胞-凝胶复合物种植在一侧肌腱的接缝上,另一侧则仅种植肌腱细胞。40 小时体外培养后发现,复合物中的细胞形态延长,并沿收缩方向呈极性排列,随着种植细胞数量的增多,这种细胞方向性排列的现象更加明显,且出现细胞核拉长。这些由胶原纤维收缩产生的机械刺激导致细胞核形态的改变可能会有利于诱导 BMSC 向成纤维细胞系分化并启动后续的胞外基质合成。在 4、8、12 周等时间点,分别用生化学和组织学标准评价肌腱的修复情况。结果显示,用 BMSC 处理的肌腱与对照组相比具有更大的横切面,在负载的结构和物质特性上较对侧好两倍,而且负载性能在继续改善,胶原纤维的装配也比对照组要好一些。Sahoo 等把 BMSC 种植于混合生物支架材料后应用于动物实验,证实 BMSC 与相应的生物材料相结合,能够使大的肌腱损伤得以更好的修复。

(五) BMSC 与复合组织的修复

有学者进行构建组织工程化关节结构的尝试,这些研究多集中在颞下颌关节。Alhadlaq 等用聚乙二醇凝胶依照人颞下颌关节髁的解剖形态制作出假体,取小鼠 BMSC 分别向成软骨和成骨方向诱导后分层种植于假体上,然后将假体植入小鼠背部皮下,4 周后发现植入的细胞分别表达软骨细胞和成骨细胞的表面标志物,并形成类软骨和类骨基质。这些工程化下颌骨关节突构建方面的进展对于骨科领域中基于 BMSC 的工程化关节等复合组织的研究有很大的启发。

三、总结与展望

尽管对 BMSC 的研究还有很多的未知,但是由于其具有多向分化潜能和高增殖扩增的特性,同时取材容易,对机体损害较小,组织相容性好,进行移植时不存在组织配型及免疫排斥等特点,且 BMSC 的细胞增殖分裂模式使外源基因易于导入和表达,被认为是组织工程和潜在基因工程治疗的理想靶细胞。目前对 BMSC 的研究也越来越深入,同时取得了许多可喜的成绩。BMSC 与相应的生物材料相结合,能修复骨、软骨、肌腱、肌肉等多种组织,有些已不仅仅局限于实验研究,而是已试用于临床患者的治疗,也取得了满意的疗效。BMSC 作为种子细胞在骨组织工程中的研究前景将非常广阔,并可能会产生不可估量的成果。

但目前仍有许多问题有待解决,如:①如何得到纯度更高的 BMSC,由于对 BMSC 的研究方向及分离方法等的差异,且目前的研究还不系统全面,缺少横向联系,因此使得分离方法几乎不可能达到完全纯化;②细胞的鉴定问题,虽然 BMSC 存在多个表面标记物可以用来鉴定,但是这些标记物缺乏特异性,寻找特定的 BMSC 表面标记物是研究组织工程的方向之一;③BMSC 的生长、分化规律,归巢能力以及植入体内后的分化能力、分化方向的控制,是否能长期维持期望的细胞表型表达而不蜕变,它的免疫原性和调控它增殖与分化的因子等问题有待研究;④调控 BMSC 的体内微环境以及怎样控制或模拟这些微环境;⑤BMSC 的应用与生物材料密不可分,能否找到一种理想的复合载体;⑥作为基因治疗载体或基因修饰后的 BMSC 植入体内后的临床疗效,可控性和安全性如何。

此外,不同的胚胎组织已经用来研究 MSC 的存在,人类早期妊娠胎儿的骨髓、肝脏以及血液,中期妊娠胎儿的骨髓、肝脏、肺、脾脏、胰腺和肾脏等都被证实富含 MSC。Zuk 等的研究小组首次成功分离脂肪来源间充质干细胞(ADSCs),由于其不仅具有很强的体外扩增能力和多向分化潜能,且来源充足、易于分离培养,也成为了继 BMSC 后的研究新热点。随着对 MSC 研究的深入和上述一些基本问题的解决,相信在不久的将来,MSC 的合理应用将为骨科疾患的治疗开创一个崭新的境界。

(李楠 王魁星 李刚)

参 考 文 献

1. Chen GD, Yang HL, Wang GL, et al. Osteogenic differentiation and clinical application of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2010, 14 (49): 9272-9276
2. Ding Z, Yang SL. Biological characteristics and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2011, 15(1): 147-150
3. Jing H, Xiao ZM. Application of bone mesenchymal stem cells in the plerosis of orthopedic diseases. *Chin J Clin Rehab*, 2006, 10(45): 118-120
4. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*, 2006, 39(4): 678-683
5. LeBlanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003, 579(1): 11-20
6. Li LS, Zhang H, Wang CJ, et al. Isolation methods and biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2010, 14(10): 1869-1873
7. McIntosh KR, Bartholomew A. Stromal cell modulation of the immune system: a potential role for mesenchymal stem cells. *Graft*, 2000, 3: 324-328
8. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, et al. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol*, 1985, 13 (4): 237-243
9. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, 75(3): 389-397
10. Zhang K, Wang Y, Xing GS. Bio-characteristics and multi-differentiation potency of mesenchymal stem cells. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2008, 12(3): 539-542
11. Zhao DC, Wang YL, Dang YX, et al. Application progress of bone marrow mesenchymal stem cells in tissue-engineering research. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2011, 15 (49): 9271-9274
12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228
13. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(11): 1783-1787
14. 戴双武, 丁帅, 李章华. 骨髓间充质干细胞治疗股骨头坏死研究进展. *中国医药导报*, 2010, 7(1): 16-21

15. 邓红文,刘耀中. 骨生物学前沿. 北京:高等教育出版社, 2006;1-343
16. 米坤龙,卫小春. 骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损研究进展. 实用骨科杂志,2008,14(1):15-17
17. 吴优,尹庆水. 骨髓间充质干细胞治疗骨科常见病的研究进展. 解剖学研究,2010,32(4):294-297
18. 朱付平,熊光仲,王万春,等. 骨髓间充质干细胞在骨科中应用的研究进展. 中国中医骨伤科杂志,2005,13(5):78-81

第二节 诱导多能性干细胞与骨科疾病

一、诱导多能性干细胞概述

人体内的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)在经历了一系列限制分化潜能的分化作用后可以逐渐从多能状态(multipotent state)转变成某种高度特异性的体细胞状态,而且一般认为这个过程是不可逆的。1952年 Robert William Briggs 和 Thomas Joseph King 在 PNAS 上发表文章,他们成功地将一个青蛙的卵母细胞的核去除后,移入了一个青蛙的成体细胞的细胞核,并将这个卵母细胞培养,使其发育成为了一个完整的个体。这是世界上首次的动物克隆,“多莉”羊也就是在这个工作的基础上完成的。而早在 1989 年,Harold Weintraub 等的开

创性研究就显示,在细胞内过表达转录因子 MyoD 就可以将成纤维细胞和其他细胞改造成骨骼肌细胞,这些都是早期的体细胞重编程技术。

2006 年 Shinya Yamanaka 和他的同事发现,将一些转录因子转入细胞之后就能够彻底改变细胞的命运,这种重编程方法也可以达到核移植重编程实验的功效。这是一个划时代的伟大实验,诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)技术可以带动从细胞治疗、疾病建模到个性化医疗等等,涉及面非常广的研究项目。

Yamanaka 小组利用同源重组技术将 β -geo(融合的 β -半乳糖苷酶基因和新霉素抗性基因)插入小鼠的 Fbx15 基因序列中,这样当 Fbx15 被激活时,细胞就会产生抗性从而对 G418 耐受。然后,他们选出了 24 个与小鼠胚胎干细胞多能性维持和自我更新有关的基因导入小鼠,在基因导入 3 天后,在培养基中加入 G418,这样发生了转变的细胞,也就是表达 Fbx15 的细胞由于具有 G418 抗性而能够存活,其他细胞则被 G418 杀死。他们用依次减少的方法逐个剔除非必需的转录因子,最终发现只需要 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 四个转录因子就足以完成重编程操作。此后 iPS 操作技术方面又出现了很多重要的改进,但是最初的由 Yamanaka 等开展的工作还是至今为止最为基础的 iPS 细胞研究工作(图 2-4-2-1)。

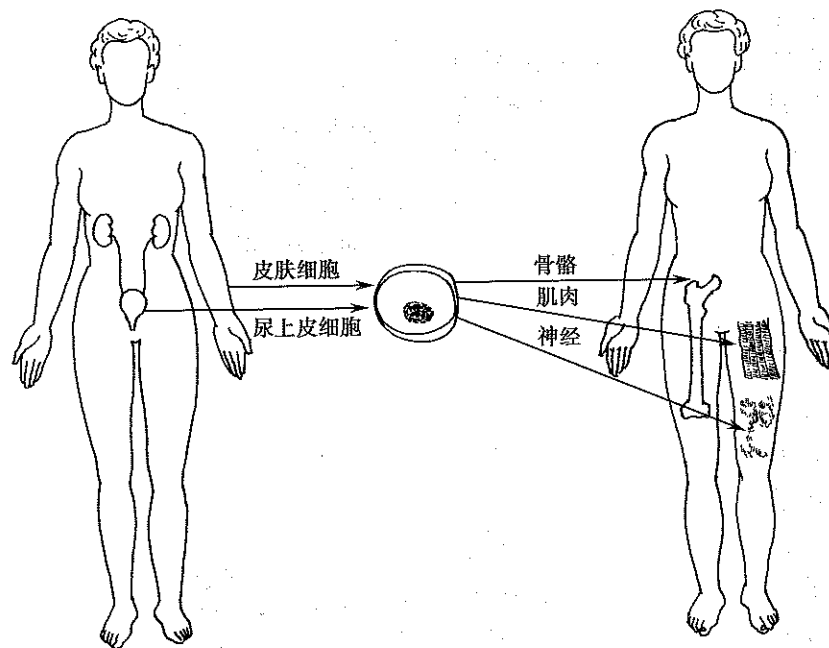


图 2-4-2-1 多能性干细胞向其他组织细胞分化