

• 细胞治疗专题 •

间充质干细胞治疗

李艳菊¹ 刘洋² 王茜³

(1. 南方医科大学 珠江医院 血液科, 广东 广州 510282; 2. 北京协和医学院; 3. 复旦大学医学院)

关键词: 间充质干细胞; 细胞治疗; 组织工程

中图分类号: R456 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2008)10-0751-03

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells MSCs) 是骨髓中存在的一类成体干细胞, 具有高度可塑性而且来源广泛, 易于在体外扩增, 是目前细胞治疗和组织工程治疗研究的热门的种子细胞, 具有广阔的临床应用前景。

1 什么是 MSCs

MSCs 是属于中胚层的一类多能干细胞, 主要存在于结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含量最为丰富, 由于骨髓是其主要来源, 因此又统称为骨髓间充质干细胞 (BMMSCs)。它具有以下特性: 1) 自我更新能力。MSCs 通过不对称分裂一方面实现增殖与分化, 同时维持自身干细胞数量的稳定。2) 多向分化力和修复损伤能力。MSCs 具有广泛的分化潜能, 在一定的分化条件下可以分化为成骨细胞、脂肪细胞等间质细胞, 而且可以跨胚层分化为神经元、神经胶质细胞、内皮细胞^[1-5]。3) 强大的增殖能力。MSCs 在体外具有很强增殖能力, 并且可以长时间保持其未分化状态, 如本实验室建立的培养方法能有效扩增 MSCs 传代 20 代以

上仍能保持细胞分裂能力和分化潜能^[6]。4) 低免疫原性和免疫调节功能。MSCs 低表达或不表达 MHC-I 和 MHC-II 类分子, 不表达共刺激分子 CD80、CD86、CD40, 这种作用不受 MHC 限制的, 所以异体的 MSCs 具有低免疫原性^[7,8]。大量实验证实 MSCs 在体外具有免疫抑制功能, 它能够抑制由异体抗原或非特异性丝裂原植物血凝素 (PHA) 引起的 T 细胞增殖反应而具有免疫抑制能力^[9]。5) 分泌细胞因子的能力。随着对 MSCs 的深入研究, 目前认为 MSCs 除了具有多向分化潜能, 还能在损伤局部反应性分泌各种各样的营养因子, 这些因子包括脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经生长因子 (NGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR₂)、碱性成纤维生长因子 (bFGF) 等^[10-14], 这些因子也参与了组织器官的损伤修复。

2 MSCs 的加工处理

1.1 诱导分化 MSCs 在合适的培养体系中可以向多种组织细胞分化, 如成骨细胞、软骨细胞、肌腱细胞、肌细胞、脂肪细

胞、心肌细胞、神经细胞、肝细胞和内皮细胞等。本实验室将 MSCs 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 $10 \mu\text{g/ml}$ 胰岛素、 0.5 mmol/L 3 异丁基 -1 甲基黄嘌呤的培养基下培养, MSCs 能够向脂肪细胞转化^[15], 将 MSCs 在 10 g/L 表皮生长因子, 1 200 U/ml bFGF 下培养, MSCs 能够向神经细胞转化^[6]。

1.2 基因转染 MSCs 是易于外源基因的转染和表达, 而且转染的外源基因能够长期表达, 并且不影响 MSCs 的体外增殖能力和多向分化能力, 将促红细胞生成素基因转染 MSCs 可使 MSCs 分泌促红细胞生成素, 加速造血干细胞的分化^[16], Gao 等^[17] 通过逆转录病毒载体将 VEGF 基因转入 MSCs 体外实验检测到 VEGF 基因可以稳定表达 3 个月, MSCs 联合 VEGF 基因转染有助于 MSCs 治疗缺血性心脏病。

3 BMMSCs 的临床应用

3.1 器官移植 Sbrano 等^[18] 将 MSCs 静脉输注后, 能够抑制同种移植皮片排斥反应。也有学者将 MSCs 用于防止心脏移植的慢性免疫排斥反应, 有待取代经典的免疫抑制剂疗法^[19]。由于 MSCs 能够抑制同种异体的 T 细胞增殖^[20], 最近有研究发现中剂量的 MSCs ($3.4 \times 10^5 / \text{kg}$) 联合造血干细胞 (hematopoietic stem cells HSCs) 输注有利于避免 GVHD 的发生, 但同时复发率相对 HSCs 单独移植组显著增高, 故提议 MSCs 大规模的应用于临床必须将其安全性量化^[21]。本实验室用体外扩增培养的 MSCs 与脐血 MNCs 共移植, 能加快裸鼠骨髓的造血恢复, 且未增加移植相关死亡率。我们检测肝、脾、肠、肺、脑、皮肤等组织病理切片检查示, 移植脐血 MNCs 和 MSCs 后各组织的结构基本正常, 说明移植 MSCs 并不加重急性 GVHD。结果显示人 MSCs 和脐血 MNCs 共移植能加快裸鼠体内造血恢复, 能耐较大剂量 MNCs 的输入而无加重急性 GVHD 等不良反应^[22]。

3.2 心血管系统疾病 体外和体内实验都证实 MSCs 可以向心肌细胞分化, 将 MSCs 移植到心肌损伤大鼠模型, 受体的心室功能得到改善, 移植的细胞表达心肌的表型。Chang 等^[23] 将骨髓 MSCs 注入心肌梗塞大鼠梗塞区的边缘, 梗塞区域出现新生心肌细胞, 心功能明显改善。通过导管将骨髓和外周血干细胞 (PBSCs) 移植给冠状动脉硬化性心脏病患者, 结果发现移植干细胞可以明显改善患者梗死区的室壁运动, 而且梗死区新生细胞明显增加^[24]。这些研究结果显示间充质干细胞移植在心血管疾病中的治疗效果。

3.3 神经系统疾病 本实验室培养经采用生长良好的第 3 代 MSCs 进行向 NSCs 的诱导分化, 应用维甲酸向神经干细胞的诱导分化并获得成功, 诱导 MSCs 产生神经元表型^[6]。Fuentes 等^[25] 将 3.5×10^5 个胎儿腹侧中脑细胞和 8×10^4 个的基质细胞移植入由 6-OHDA 所造的帕金森模型纹状体内, 发现基质细胞的移植可显著减少旋转次数, 但不如胎儿中脑细胞移植减少的程度大, 从而说明提高基质细胞的定向分化程度是治疗的关键。Miyama 等^[26] 先将 Notch 基因的细胞外区域转染入 MSCs 再用 bFGF、CNTF 诱导 MSCs 转化为神经细胞, 然后把这种 MSCs 来源的神经细胞 (MSDNC) 移植入中风大鼠损伤侧, 发现约有 45% MSDNC 存活, 84% 表达神经元标志, MAP2 仅 $(1.0 \pm 0.123)\%$ 表达 GFAP, 并从移植部位

迁移到损伤周围区域, 证实了 MSDNC 对中风有治疗作用。

3.4 对肠辐射损伤的修复 本实验室将 C57BL/6 雌性小鼠给予 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身致死量照射后, 尾静脉移植 C57BL/6 雄性小鼠的骨髓 MSCs 和骨髓单个核细胞, 治疗组的生存率较其它组显著升高 ($P < 0.05$), 病理切片显示对肠道损伤有明显修复, PCR 检测显示修复的细胞来源为供鼠细胞, 骨髓 MSCs 联合骨髓单个核细胞移植有促进肠道辐射损伤修复的作用, 其作用优于单纯的骨髓单个核细胞移植, 为骨髓 MSCs 用于修复肠道辐射损伤提供了试验依据^[15]。

3.5 对糖尿病足的治疗 糖尿病足是糖尿病的严重并发症, 张海君等^[27] 抽取患者自体骨髓血 350 ml 分离单核细胞悬液约 40 ml 进行缺血下肢的多点肌肉注射。结果发现, 移植后 2 个月, 足部疼痛改善率为 84.6%, 小腿疼痛缓解率为 100%, 患肢冷感明显改善或消失。提示该疗法有可能改善缺血下肢血流, 是 1 种简便、安全、有效的糖尿病足治疗手段, 值得进一步研究。

4 BMMSCs 的展望

MSCs 来源充足, 易于获得, 易于体外扩增, 有多向分化能力, 同时具有低免疫原性和免疫调节功能, MSCs 已成为体内基因治疗的靶细胞, 并被看作是转基因的潜在体, 拓宽了 MSCs 的研究领域, 具有广泛的临床应用前景, 但是还有许的问题亟需解决, 纵观这些研究用于动物水平的占有相当大的比例, 所以有待于 MSCs 更多地应用于临床; 虽然 MSCs 具有多向分化能力, 但移植的细胞是否具有功能, 还需要进一步解决 MSCs 的质化问题。MSCs 的低免疫原性、免疫调节功能和分泌细胞因子的能力使其成为生物治疗的亮点之一; MSCs 的最高研究目标是能够用于三维的组织工程研究, 但三维组织工程的临床应用还有一段距离。上述关键问题的深入研究将会加大认识 MSCs 的细胞生物学特性和细胞生物学行为, 为 MSCs 临床应用奠定坚实的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ladage D, Brixius K, Steingen C, et al. Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms [J]. *Endothelium*, 2007, (2): 53-63
- [2] Alexanian AR, Maiman DJ, Kupad SN, et al. In vitro and in vivo characterization of neurally Modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment [J]. *Stem Cells Dev* 2008, (17): 1231-1252
- [3] Deng X, Chen YX, Zhang X, et al. Hepatic stellate cells modulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells [J]. *J Cell Physiol* 2008, (15): 56-67
- [4] Zhao D, Wu H, Li F, et al. Electromagnetic field change the expression of osteogenesis genes in murine bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Univ Sci Technol Med Sci* 2008, 28(2): 152-155
- [5] Dezawa M. Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases [J]. *Med Mol Morphol* 2008, 41(1): 14-19

- [6] 陈伟, 李江琪, 林竞初, 等. 体外人骨髓基质细胞克隆培养及分化特性的研究 [J]. 中国临床康复, 2004, 3: 1486-1489
- [7] Niemeyer P, Komacker M, Mehlfom A, et al. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro [J]. Tissue Eng 2007, 13(1): 111-121
- [8] le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience [J]. J Intern Med 2007, 262(5): 509-525
- [9] Glennie S, Soeir OL, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells [J]. Blood 2005, 105(7): 28212-28217
- [10] John HJ. Sex and aging [J]. N Engl J Med 2007, 357(8): 820-822
- [11] Barbara L. Marshall the new virility: viagrā male aging and sexual function. Sexualities Jul 2006, 9(13): 345-362
- [12] Neves D, Santos J, Tamada N, et al. Aging and Orchidectomy Modulate Expression of VEGF Receptors on Corpus Cavemosum of the rat. Ann N. Y. Acad. Sci 2006, 1067: 164-172
- [13] Smith CP, Stein JJ. Changes in growth factor expression in normal aging rat retina. Invest Exp Eye Res 2007, 85(6): 817-824
- [14] Ponte AL, Marais E, Gallay N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities [J]. Stem Cells 2007, 25(7): 1737-1745
- [15] 李宁, 李艳菊, 丁振华, 等. 骨髓间充质干细胞联合骨髓单个核细胞对肠辐射损伤修复作用的研究 [J]. 实用医学杂志, 2008, 10
- [16] Mok PL, Cheong SK, Leong CF, et al. In vitro expression of erythropoietin by transfected human mesenchymal stromal cells [J]. Cytotherapy 2008, 10(2): 116-124
- [17] Gao F, He T, Wang H, et al. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats [J]. Can J Cardiol 2007, 23(11): 891-898
- [18] Sbrano B, Cuccia A, Mazzanti B, et al. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model [J]. Arch Dermatol Res 2008, 300(3): 115-124
- [19] Zhou H, Jin Z, Liu J, et al. Mesenchymal stem cells might be used to induce tolerance in heart transplantation [J]. Med Hypotheses 2008, 70(4): 785-787
- [20] Karlsson H, Samanasinghe S, Ball LM, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T cell responses [J]. Blood 2008, 20(3): 513-519
- [21] Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between co-transplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study [J]. Leukemia 2008, 22(3): 593-599
- [22] 林竞初, 郭坤元, 李江琪. 人间充质干细胞对裸鼠体内造血重建影响的实验研究 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(): 752-755
- [23] Chang SA, Lee EJ, Kang HJ, et al. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation [J]. Stem Cells 2008, 10(4): 185-193
- [24] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction [J]. Circulation 2002, 106(24): 3009-3017
- [25] Pavon-Fuentes N, Blanco-Lezcano L, Martínez-Martín L, et al. Stromal cell transplant in the 6-OHDA lesion model [J]. Rev Neurol 2006, 39(4): 326-334
- [26] Minuma T, Dezawa M, Kanno H, et al. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells [J]. J Neuropathol Exp Neurol 2005, 64(12): 1108-1117
- [27] 张海君, 谷涌泉, 郭连瑞, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗重症糖尿病足的效果 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(33): 1162-1168

(2008-07-04收稿)

本文编辑:蔡辉 尚云