

• 综述 •

间充质干细胞在组织工程中应用*

张燕搏 综述; 王强 审校

(北京协和医学院 中国医学科学院 阜外心血管病医院小儿心脏中心 PICU, 北京市 100037)

[摘要] 间充质干细胞具有多项分化潜能, 且遗传背景稳定、抗原性小、临床易于培养扩增, 是组织工程理想的种子细胞, 优质的种子细胞是构建组织工程化血管的重要环节, 也是当前研究的热点, 本文就间充质干细胞在组织工程中的应用前景作一综述。

[关键词] 组织工程; 间充质干细胞; 种子细胞; 分化

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 1674-3474(2012)03-0209-02

组织工程化血管的研究主要集中在种子细胞、支架材料和细胞外基质 3 个方面, 选择合适、优质的种子细胞是研究的核心和构建组织工程化血管的首要步骤^[1]。近年来, 干细胞成为此类研究的热点^[2-3]。干细胞是具有自我更新能力、在适宜微环境下具有多系分化潜能的原始细胞, 包括胚胎干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 等。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有多向分化潜能, 在一定条件下可向成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、肌肉细胞等进行分化, 有广泛应用前景。本文就 MSCs 生物学特性、体外分离培养和鉴定方法、临床应用前景等综述如下。

1 MSCs 来源

德国病理学家在研究动物伤口愈合过程中首次提出存在间充质干细胞可能, 1991 年 Caplan 正式提出 MSCs 概念^[4-5]。MSCs 具有干细胞共性: (1) 本身不处于分化途径的终端, 可无限增殖分裂; (2) 可连续分裂几代或在较长时间内处于静止状态; (3) 通过 2 种方式生长, 对称分裂: 形成 2 个相同的干细胞; 非对称分裂: 1 个子细胞不可逆的走向分化终端成为功能专一的细胞, 另 1 个保持亲代特征, 作为干细胞保留。MSCs 来源较多, 其中骨髓是其最主要来源。

1.1 骨髓来源 MSCs 目前报道较多的是来自成人骨髓的 MSCs, 骨髓中 MSCs 所占比例较小, 但其扩增能力极强, 约扩增 1 亿倍仍保持干细胞特性^[6-7]。有研究结果^[8]证实, 胎儿 BMSCs 在形态、免疫表型、生长动力等方面与成人相近, 亦可向骨、脂肪等组织分化。

1.2 脂肪组织来源 MSCs 脂肪组织是 MSCs 的另一主要来源^[9]。Zuk 等^[10]从人体脂肪中分离出成纤维样细胞克隆, 这些细胞大部分是中胚层或间充质来源, 可向脂肪细胞、肌肉细胞、成骨细胞和软骨细胞分

化。因脂肪组织含量丰富且较易获取, 如能替代骨髓成为 MSCs 的主要来源, 将有广阔应用前景, 但目前尚无理想的扩增脂肪 MSCs 方法, 且脂肪 MSCs 与 BMSCs 在结构、功能及生物学特性方面的异同还有待研究。

1.3 脐血、脐带、胎盘来源的 MSCs 有学者^[11]从脐血中分离得到的 MSCs, 在形态、表面标志抗原、自我更新、多向分化能力及可塑性等方面均与骨髓来源的 MSCs 相似。研究结果^[12]显示, 胎盘也是 MSCs 的来源, 从羊水、羊膜分离的 MSCs 来源于胎儿, 从基蜕膜、壁蜕膜分离的 MSCs 来源于母体, 而二者来源的 MSCs 扩增潜能均高于 BMSCs。如能将胎盘组织中的 MSCs 分离、收集并保存起来, 将会给人类多种器官系统的修复与重建带来新希望。

1.4 外周血来源的 MSCs Zvaifler 等^[13]根据其在正常人外周血中分离出了易贴附培养皿表面、呈成纤维细胞样形态、表达 MSCs 标志并有成骨分化倾向的细胞, 提出外周血中含有 MSCs。

2 MSCs 体外分离培养和鉴定

2.1 MSCs 分离培养及生物学特征^[14] 目前从骨髓中获取 MSCs 的方法有密度梯度离心法、贴壁法、免疫学法及氯化铵溶血法, 前 2 种方法因操作简单、对细胞损伤小, 目前被广泛采用, 其中用 Percoll 方法分离培养的 BMSCs 大小均匀、纯度较高, 但目前尚无确切可行的方法来获得纯化的 MSCs。

骨髓中大约每 $10^4 \sim 10^5$ 个单核细胞中仅含有 1 个 MSCs, 因此获取 MSCs 后要经过体外传代扩增。培养 MSCs 常用含质量分数 5% ~ 20% 胎牛血清 (其中 20% 较常用) 的 DMEM 培养基。不同物种的 BMSCs 特性不同, 不同培养基、血清浓度、细胞接种密度、换液时间、酶消化时间、培养基 pH 值均可对其生长产生一定影响。细胞的接种密度, 各实验室不尽相同, 多数学者认为由于培养过程中细胞间可发生接触抑制、细胞在培养过程中可能分泌某种物质, 高密度传代培养的细胞生长缓慢。Lin 等^[15]在培养 MSCs 过程

*基金项目: 国家自然科学基金 (30471721); 国家自然科学基金 (30670928); 国家自然科学基金 (81070055)。

作者简介: 张燕搏 (1975 年—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 复杂先天性心脏病围术期处理。

中加入低钙及有抗氧化作用的生长介质后可明显加快细胞生长速率、延长细胞寿命。

2.2 MSCs 表面标记物^[16-17] 目前 MSCs 所表达的主要分子包括:(1)黏附分子:CD166,CD54,CD102,CD44,CD106 等;(2)生长因子和细胞因子受体:白细胞介素(interleukin, IL)-1R,IL-3R,IL-4R,IL-6R,IL-7R,γ 干扰素受体、肿瘤坏死因子-α 等;(3)整合素家族成员:CD49a,CD49b,CD49c,CD29,CD104 等;(4)其他:CD90,CD105 等。因仍未筛选到 MSCs 特异标记分子,无法直接对其进行鉴定,各实验室鉴定 MSCs 方法一般均是通过在培养过程中出现的分化表型来反推其是否为 MSCs,筛选时阴性反应也可作为一定参考。

3 MSCs 分化潜能

MSCs 具备干细胞 2 个重要特征,即强大自我增殖能力和多向分化潜能,后者被认为是 MSCs 最重要生物学特性,即在一定条件下, MSCs 有向很多中胚层细胞,如成骨、软骨细胞、肌腱、韧带、心肌细胞、脂肪细胞等分化的能力。最近研究结果^[18]发现, MSCs 可跨越胚层界限分化成许多非中胚层细胞,如外胚层的神经元、神经胶质细胞,内胚层的肝细胞等。MSCs 具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控,在培养基中加入一定诱导剂可诱导 MSCs 向一定方向分化。

4 MSCs 临床应用前景

因 MSCs 易于分离和体外扩增、易于外源基因导入和表达,免疫原性弱、移植后不需免疫治疗;骨髓再生能力强,耐受反复操作,使其成为细胞替代治疗和基因治疗的理想选择,有重要临床应用前景。

4.1 促进造血植入 有动物实验^[19]证实,在清髓处理后 MSCs 与造血干细胞联合输注对造血重建有促进作用,可提高后者移植成功率,这为 MSCs 促进造血的临床应用提供了依据。MSCs 支持造血的机制可能与其可分泌某些造血生长因子及其表达的黏附分子在造血干细胞归巢中起重要作用有关。

4.2 组织工程 由于 MSCs 易获取、可向多种中胚层及部分其他胚层细胞分化、基因表达有组织特异性、体外培养可稳定增殖又无明显致瘤性,因此是理想的组织工程种子细胞。以 MSCs 与医用高分子材料构建的支架相结合,建立三维生物反应堆,经先体外后体内的方法用于创伤性疾病、骨及软骨组织工程、心脏疾患中均有良好的应用前景,有可能实现组织、器官修复和重建^[20-21]。

5 结语

MSCs 的应用价值已得到肯定,但真正将其应用于临床仍存在许多问题:(1)以目前常用方法分离得到的 BMSCs 异质性大、难以克隆,而通过克隆性好的分离方案获得的 BMSCs,分化潜能又不及常用方法;(2)目前尚未明确鉴定 MSCs 的准确方法,特异性标记分

子未统一,常用方法仅是通过培养过程中出现的分化表型来推论是否为 MSCs;(3)转染的外源基因是否可影响 MSCs 的分化潜能目前尚存争议;(4)不同来源的 MSCs 之间存在哪些差异、如何相互影响有待阐明;(5)体内可能不存在 MSCs,只是在培养分离到的细胞时,这些细胞被激发转变或者程序重调,成为具有胚胎干细胞特性的细胞。

尽管如此,由于 MSCs 具有公认的多向分化性,仍为理想组织工程种子细胞之一,对其研究所取得的成果将会给某些疾病的治疗提供新的途径。

参考文献

- [1] 张燕搏,姜明,王强,等.组织工程血管材料体外细胞毒性评价实验研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(6):539-542.
- [2] Redzic A, Smajilagic A, Aljicevic M, et al. *In vivo* osteoinductive effect and *in vitro* isolation and cultivation bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Coll Antropol, 2010, 34(4):1405-1409.
- [3] Hilfiker A, Kasper C, Hass R, et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation[J]. Langenbecks Arch Surg, 2011,396(4):489-497.
- [4] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. Exp Hematol, 1976,4(5):267-274.
- [5] Caplan A I. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991,9(5):641-650.
- [6] Lee J S, Hong J M, Moon G J, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke[J]. Stem Cells, 2010,28(6):1099-1106.
- [7] Franco Lambert A P, Fraga Zandonai A, Bonatto D, et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work[J]. Differentiation, 2009,77(3):221-228.
- [8] Zeddu M, Briquet A, Relic B, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood[J]. Cell Biol Int, 2010,34(7):693-701.
- [9] Rodriguez A M, Elabd C, Amri E Z, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Biochimie, 2005, 87(1):125-128.
- [10] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001,7(2): 211-228.
- [11] Lee O K, Kuo T K, Chen W M, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. Blood, 2004,103(5):1669-1675.
- [12] In't Anker P S, Scherjon S A, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta[J]. Stem Cells, 2004,22(7):1338-1345.
- [13] Zvaipler N J, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals [J]. Arthritis Res, 2000,2(6):477-488.
- [14] Castillo A B, Jacobs C R. Mesenchymal stem cell mechanobiology[J]. Curr Osteoporos Rep, 2010,8(2):98-104.
- [15] Lin T M, Tsai J L, Lin S D, et al. Accelerated growth and

- prolonged life span of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(1):92-102.
- [16] Park J S, Hashi C, Li S. Culture of bone marrow mesenchymal stem cells on engineered matrix[J]. Methods Mol Biol, 2010, 621:117-137.
- [17] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8):875-884.
- [18] Justesen J, Stenderup K, Eriksen E F, et al. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell culture[J]. Calcif Tissue Int, 2002, 71(1):36-44.
- [19] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8):875-884.
- [20] 张燕搏, 姜明, 胡平, 等. 聚氨酯不同低温等离子体改性生物相容性评价[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(10):944-946.
- [21] 张燕搏, 姜明, 王强, 等. 动态反应器构建组织工程化血管的初步实验研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(11):1047-1049.

收稿日期: 2011-12-04 修回日期: 2011-12-21
(本文编辑: 王君秋)