

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.03.022

骨髓间充质干细胞在骨缺损修复中的研究及应用进展*

张 聪 综述 孟纯阳 审校

(济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272067)

摘 要 各种因素造成的骨缺损是临床常见疾病,因骨结构改变、成骨细胞的缺乏、生长因子和新生血管的不足等原因致使该疾病治疗令临床医师们困惑难待。骨髓间充质干细胞具有低免疫源性、易获得性、分化成骨性等优点,尤其是近 10 年来骨修复支架材料的研发和基因工程的发展使得其更加受到临床医师的青睐。虽然部分已应用于临床,但多数还处于实验研究阶段,许多问题还有待于进一步探索和研究。

关键词 骨髓间充质干细胞;骨缺损;组织工程骨

中图分类号:R683 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9760(2013)06-225-04

骨缺损是临床常见的疾病,是由创伤、肿瘤切除、畸形矫正以及感染等各种因素造成的。由于骨缺损造成骨结构的改变,往往使骨的愈合成为奢望,即使能够愈合,也常需要一年或更长时间^[1],同时需要相关固定和制动,且制动卧床易导致多种并发症,如褥疮、呼吸系统感染、泌尿系统感染、患肢废用性萎缩等,给家庭和社会造成严重的负担,也严重影响了患者的劳动能力和生存质量。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)由 Friedensten 等^[2]最先发现,其具有成骨分化潜能,取材方便、体外生长迅速,在体外一定条件诱导下能够定向分化为成骨细胞,并且有较强的传代能力,回输体内后高效稳定增值等优点,成为修复骨缺损的良好种子细胞。对于严重或大块骨缺损,即使我们采用自体骨、异体骨或组织工程骨植入,除植骨周围有少量细胞存活外,大部分骨缺损内缺乏足够的 BM-MSCs,延迟了愈合时间。因此,向骨缺损部位引入足够的 BM-MSCs 是促进骨缺损修复的重要细胞学基础和前提条件^[3]。BM-MSCs 作为骨缺损修复的种子细胞已越来越受到关注,已经成为 21 世纪再生医学研究的主要热点之一。笔者就 BM-MSCs 在骨缺损修复中的研究进展综述如下。

1 骨髓间充质干细胞的生物学特性

BM-MSCs 来源于骨髓间质,约占骨髓内单个核细胞数的 1/104 ~ 1/55,并随年龄的增加而减少,但是其扩增能力很强,在指数增长长期时间约需

要 30h 左右,且其体外传 40 代仍然具有干细胞特性。BM-MSCs 就有跨系谱、跨胚层分化的潜能^[4],向内中外三胚层分化,不仅可以分化为造血基质细胞,还可以分化为许多造血以外的组织细胞,如内皮细胞、肝细胞、肺上皮细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌腱细胞、脂肪细胞、心肌细胞等中胚层细胞,同时又有外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆细胞分化的能力。

BM-MSCs 最初的分离培养方法系 Friedensten 在 1987 年建立的贴壁分离筛选法,目前用于 BM-MSCs 纯化分离的方法主要包括 4 种:1)贴壁分离筛选法:也称全骨髓培养法,是根据 BM-MSCs 贴壁生长而造血系细胞悬浮生长的特性,通过定期换液以除去非贴壁细胞。此法虽被认为粗糙,但操作简单方便,分离纯度较高。2)密度梯度离心法:原理是根据估算中细胞成分比重不同及 BM-MSCs 的细胞密度大小,进行密度梯度离心,得到单个核细胞,再配合上述 1)方式进一步分离纯化,其纯度可达 95%。3)流式细胞仪筛选法:主要是根据细胞大小来实现分离,利用一种有微小孔径的培养皿从骨髓中筛选 BM-MSCs 这种方法分离出 BM-MSCs 均质性高,但细胞成骨活性低,培养发现大多数不贴壁,并在 24h 内死亡,可能是分选过程中机械剪切力造成了 BM-MSCs 损伤。4)免疫磁珠分离法:其原理是通过 BM-MSCs 表面带有抗原成分或缺失抗原成分进行筛选,从而得到相对纯化的 BM-MSCs,但是其无特有标记分子,所以该方法在实际应用中有一定的局限性^[5]。

目前研究表明 BM-MSCs 并无独特的表面标志,实际应用中,采用表面标志和细胞形态学两方

* [基金项目] 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(编号 ZR2010HM090)

面对 BM-MSCs 进行鉴定是比较公认的方法。2006 年国际间充质及组织干细胞委员会 (the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) 对 hBM-MSCs (Human mesenchymal stem cells, hMSC) 提出 3 条最低的鉴定标准 1) 在标准培养条件下必须具备有对塑料瓶底物的贴壁特性。2) 通过流式细胞仪检测 BM-MSCs 群体表达 CD73、CD90、CD105 的阳性率大于 95%, 且 CD34、CD45、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19HLA-DR 阳性率表达低于 2%。3) 经体外诱导必须能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。

2 骨髓间充质干细胞向成骨分化生长的影响因素

BM-MSCs 具有多向分化的潜能特性, 而用于治疗骨缺损中需要向成骨细胞分化。BM-MSCs 体外诱导分化成骨主要经历了以下几个阶段: 转化期、增殖期、聚集分泌期、细胞外基质钙化期, 在整个诱导分化过程中可以看到成骨因子含量增高, I 型胶原合成增多, 钙结节数量增多, 逐渐变成具有成骨细胞生物活性的细胞。体外诱导 BM-MSCs 向成骨细胞分化可以使用诱导培养基^[6], 较为经典的是使用地塞米松、维生素 C、 β -磷酸甘油, 地塞米松可以促进成骨细胞分化成熟, 同时提高碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 的活性, 调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF), 促进细胞外胶原基质合成; 维生素 C 的作用是促进培养细胞合成胶原, 调节三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、ALP 活性和非胶原基质蛋白的合成; β -磷酸甘油为成骨细胞提供磷酸离子, 促进生理性钙盐沉积、钙化, 从而加速钙结节钙化过程。

另外骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、IGF-1、 $25-(OH)_2D_3$ 、透明质酸均可促进 MSCs 向骨组织分化^[7]。

3 骨髓间充质干细胞修复骨缺损的相关研究进展

BM-MSCs 具有多向分化潜能, 在体外特定实验条件下或自身骨愈合修复的微环境下可以向成骨细胞分化, 具有良好的增殖和自身移植能力, 其取材不存在伦理方面的争议^[8], 因此受到广大组织工程学学者的青睐。现根据其在骨缺损修复中应用方法不同分以下几类:

3.1 BM-MSCs 单独应用治疗骨缺损

吴志玲等^[9]抽取兔骨髓制成细胞悬液, 体外分离培养 BM-MSCs 2 周。将培养 2 周的 BM-MSCs 注射到家兔单侧桡骨缺损处, 对侧不予处理, 于移植后第 1、2、3、4 周末, 用钼靶 X 线分别检查双侧桡骨缺损处的骨形成情况, 并取第 4 周末的骨痂进行组织学检查, 结果显示移植后实验侧骨痂形成快于对照侧; 第 4 周末, 实验侧缺损处全部为骨性骨痂连接, 对照侧缺损处仍未形成骨痂连接, 说明 BM-MSCs 注射可以促进骨缺损修复。McNulty 等^[10]认为骨缺损区足够量的 MSCs 是骨修复的必要条件, 其预先使用 MSCs 动员剂 AMD3100, 促使 MSCs 向外周血中聚集, 在骨缺损处 MSCs 浓度可增加 40 倍, 组织学和 X 射线检查显示骨修复效果优于空白对照组。

3.2 非基因转染 BM-MSCs 作为种子细胞应用治疗骨缺损

用 BM-MSCs 构建组织工程骨有必不可少的 3 要素: 具有向成骨方向诱导能力的间充质干细胞、支架材料、诱导和调节成骨细胞分化的生长因子。Breitbart 等^[11]采用异体脱钙骨 (demineralized bone matrix DBM) 体外与 BM-MSCs 复合培养后, 植入股骨骨缺损的糖尿病小白鼠模型中, BM-MSCs /DBM 组与 DBM 组在第 4 周、8 周的组织学观察了解到, BM-MSCs /DBM 组有大量成骨细胞和骨基质形成。该实验显示出 BM-MSCs 作为种子细胞在可能会在糖尿病病人的骨缺损治疗中具有广阔的应用前景。NiemeyerP 等^[12]认为人源干细胞具有低免疫源性、良好成骨细胞分化性, 因此异种接种于骨材料上对大段骨缺损有良好修复作用, 试验中采用脱钙羟基磷灰石 (calcium-deficient hydroxyapatite, CDHA) 为支架材料, hMSC/CDHA、兔 MSC/CDHA、CDHA 分别植入家兔颅骨骨缺损处, 组织学、影像学、生物力学检测显示出 hMSC/CDHA 组均差于其余两组, 说明了虽然异种 MSC 具有低免疫源性, 但进行骨缺损治疗中应选取自体或同种 MSC 更为合适。Zhang 等^[13]认为人富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 含有多种生长因子, 如 PDGF、TGF- β 1、TGF- β 2、IGF、EGF, 它们对血管形成和细胞增殖发挥重要作用, 同时 PRP 能够提高 BM-MSCs 的增殖活性, 增加细胞外基质合成, 增强成骨活性。以脱蛋白骨基质 (deproteinized bone matrix, DPB) 为支架材料, 将 MSC/DPB 组与异体 PRP/DPB

组治疗家兔骨缺损,并通过组织学分析、X 线显影、骨密度测量显示出良好的骨形成和再血管化,效果优于单独使用 DPB 的对照组;同时 MSC/PRP/DPB 组在骨缺损修复中的强效骨再生和再血管化又优于上述 3 组。异体 PRP 具有低免疫源性、易获得性,不额外增加病人的健康风险,自体 MSC 与异体 PRP 在骨修复中的协同作用将会在大段骨缺损治疗中显示出巨大的发展空间和应用前景。Stockmannp 等^[14]分别分离出脂肪源性(adipose-derived,AD)、骨膜源性(periosteum-derived,PD)、骨髓源性(bone marrow-derived,BD)间充质干细胞做体外培养,将上述 3 种不同来源的 MSCs 种植于胶原支架上,然后将组织工程材料植入猪新鲜颅骨骨缺损处,并以空白支架为对照组,在早期(30d 以内)实验组与对照组在骨再生方面无差异,中期及后期(30~90d)3 个实验组在骨质含量、骨愈合方面与对照组相比均有明显优势,且在整个试验阶段 3 个实验组的 AD-MSC、PD-MSC、BD-MSC 作为种子细胞修复骨缺损方面无明显差异。Osuqi M 等^[15]采用 IGF1、VEGF 细胞生长因子的条件培养基(Cultured conditioned media,CM)体外培养 BM-MSCs,与其余 4 组无血清 DMEM/琼脂糖、无糖 DMEM/琼脂糖、PBS/琼脂糖、空白组分别植入颅骨缺损小鼠模型中,术后 8 周,CT、组织学分析。CT 显示 MSCs-CM 组比其余 4 组有大量骨组织再生,建立良好的骨桥,组织学分析显示骨缺损处有大量成骨细胞。在后期的生物力学检测中 MSCs/CM 组的抗扭曲度、抗压强度均强于其余四组,说明在一定的培养条件下 BM-MSCs 的骨缺损修复能力会进一步增强。

3.3 带有目的基因的 BM-MSCs 作为种子细胞应用治疗骨缺损

Cao 等^[16]将转血管生成素-1(Angiopoietin-1, Ang-1)基因 BM-MSCs 种植于多孔 β -磷酸三钙(tricalcium phosphate, β -TCP)支架修复新西兰大白兔桡骨骨缺损处,术后 2、4 周分别使用电子显微镜、组织学切片观察骨细胞再生和微血管生成情况,与 MSCs/ β -TCP 对照组相比差异有统计学意义,术后 12 周生物力学测定显示该组骨强度接近正常骨组织。由于使用了可有效持久释放 Ang-1,减弱了新生骨及新生血管在骨修复处处不能长入或长入缓慢的束缚,缩短了骨愈合时间。张波等^[17]观察重组 BMP2 和 VEGF165 转染 BM-MSCs 后的体外表达情况,并以含该转染体系的组

织工程骨进行山羊颅骨骨缺损的修复研究发现转基因 BM-MSCs 在转染后 1~3 周都可稳定表达 BMP2 和 VEGF,BM-MSCs 和 -TCP 支架材料植入颅骨标准骨缺损处术后 12 周,组织学观察联合基因(BMP2/VEGF165)组有明显成骨表现,骨组织结构趋于正常,可见形成较多的类骨样组织,中间为骨基质,表明携带该缓释体系的新型组织工程骨是一种具有显著成骨能力的优良骨缺损修复材料。LIN 等^[18]以 BMP4 基因转染兔 BM-MSCs,转染后的 BM-MSCs 体外培养观察 ALP、骨钙素(osteocalcin,OCN)的表达情况,然后将其植入兔颅骨缺损进行修复,结果提示 BM-MSCs 经过 BMP4 基因转染后存在较强成骨能力,与 BMP4 基因转染脂肪来源干细胞组相比,两者在体外成骨方面无较大的差异,同时 BM-MSCs 没有分化脂肪细胞的趋势。Hex 等^[19]采用将纳米硫酸钙/海藻酸钠(nano-scale calcium Sulfate/Alginate,nCS/A)制作成膏状与转染 BMP2 基因的 MSCs 混合直接注入骨缺损部位的新方法,保证了支架材料内部较高的 MSCs 数量和缺损修复区 BMP2 浓度,结果显示,该方法与 nCS/A 组和 nCS/A/MSCs 组相比有更高的骨修复能力和微血管密度。

4 现存问题与展望

虽然人们对 BM-MSCs 的研究和 BM-MSCs 应用修复骨缺损的研究取得了显著的成就,形成了自体骨移植、异体骨移植、组织工程骨移植修复骨缺损的 3 大领域,但是 BM-MSCs 作为种子细胞的应用仍有一些问题困扰、阻碍我们:1)分离纯化细胞的方法需进一步改进,大多数实验室仍是根据细胞贴壁的性质分离细胞,细胞纯度和功能不能令人满意;2)未能找到鉴定 MSCs 特异性的标记分子,鉴定标准不够完善;3)BM-MSCs 具有多向分化潜能,体外分化是否会引起细胞遗传性质的改变还有待进一步证实;4)是否植入体外诱导具有成骨细胞特性后的 BM-MSCs,还是完全依赖体内诱导环境直接植入 BM-MSCs;5)部分研究采用不同类型的材料作为支架,但哪一种材料更有利于 BM-MSCs 生长分化且生物相容性好,降解速度适当,不良反应小,仍需探索,同时最好能够研制出既有骨传导作用又有骨诱导作用的材料^[20];6)找到支架材料的最佳孔隙率、孔径大小和最佳 BM-MSCs 的植入浓度,是今后亟待解决的问题;7)临床疗效和安全性问题是 BM-MSCs 及转入某些基因后临床治疗

时需要明确的根本问题,体外长期培养的 BM-MSCs 移植到体内后是否会发生基因突变或导致肿瘤等是临床应用中最令人担忧的问题,因此,必须建立可靠的技术方法和安全评估体系;8)双基因或多基因共转染 BM-MSCs,其所表达产物间是否存在协同作用或拮抗作用有待进一步探明^[21];9)如何保持骨修复区 MSCs 足够数量,是否有必要使用 MSCs 动员药物^[22];10)虽然 BM-MSCs 修复骨缺损有部分临床报道,但多数还是在基础实验阶段,过渡于临床还需大量临床实验验证。

随着科学技术的进步和大量实验的不懈探索,重组 BM-MSCs 和支架材料已成为研究热点,持续的诱导因子和生长因子分泌表达,模仿成骨微环境,良好骨传导性和生物相容性支架材料等都是加快骨缺损修复的不可或缺条件,相信在不久的将来,BM-MSCs 在临床治疗骨缺损中发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] Khojasteh A, Behania H, Dashti SG, et al. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2012, 70(4):972-982.
- [2] Fridenstein A, Piatetskii-Shapiro I, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *Arkh Anat Gistol Embriol*, 1969, 56(3):3-11.
- [3] McNulty MA, Viridi AS, Christopherson KW, et al. Adult stem cell mobilization enhances intramembranous bone regeneration: a pilot study[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2012, 470(9):2503-2512.
- [4] Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood[J]. *BMC Vet Res*, 2012, 8(1):169.
- [5] Qian H, Badaloni A, Chiara F. Molecular characterisation of prospectively isolated multipotent mesenchymal progenitors provides new insight to the cellular identity of mesenchymal stem cells in mouse bone marrow[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(4):661-677.
- [6] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers [J]. *Bil Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(11):581-588.
- [7] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor or beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells[J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61(9):1003-1010.
- [8] Serra Moreno J, Sabbieti MG, Agas D, et al. Polysaccharides immobilized in polypyrrole matrices are able to induce osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012. [Epub ahead of print]
- [9] 吴志玲,曾东林,谢谦,等.骨髓基质细胞修复骨缺损的实验研究[J]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2010, 4(3):244-249.
- [10] Kumar S, Ponnazhagan S. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect[J]. *Bone*, 2012, 50(4):1012-1018.
- [11] Breitbart EA, Meade S, Azad V, et al. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(7):942-949.
- [12] Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(3):900-908.
- [13] Zhang ZY, Huang AW, Fan JJ, et al. The potential use of allogeneic platelet rich plasma for large bone defect treatment-immunogenicity and defect healing efficacy [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(1):175-187.
- [14] Stockmann P, Park J, von Wilmsow C, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2012, 40(4):310-320.
- [15] Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, et al. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(13-14):1479-1489.
- [16] Cao L, Liu X, Liu S, Jiang Y, et al. Experimental repair of segmental bone defects in rabbits by angiopoietin-1 gene transfected MSCs seeded on porous β -TCP scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100(5):1229-1236.
- [17] 张波.联合基因转染骨髓间充质干细胞修复颅骨标准骨缺损的实验研究[D].北京:北京协和医学院,2011.
- [18] Lin L, Shen Q, Wei X, et al. Comparison of osteogenic potentials of BMP4 transduced stem cells from autologous bone marrow and fat tissue in a rabbit model of calvarial defects [J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 85(1):55-65.
- [19] He X, Dziak R, Mao K, et al. Integration of a novel injectable nano calcium sulfate/alginate scaffold and BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells for bone regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(3-4):508-518.
- [20] Tucker BA, Karamsadkar SS, Khan WS, et al. The role of bone marrow derived mesenchymal stem cells in sports injuries[J]. *J Stem Cells*, 2010, 5(4):155-166.
- [21] Sch? nmeyr BH, Soares M, Avraham T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits bone morphogenetic protein 2 expression in rat mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(2):653-662.
- [22] Pitchford SC, Rankin SM. Combinatorial stem cell mobilization in animal models[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 904:139-154.

(收稿日期 2013-03-24)