

骨髓间充质干细胞在难愈性创面治疗中的研究进展

池 凯 薛宏斌 高栋梁 冯登超

一、BMSCs 的概念和来源

骨髓间充质干细胞的观点最先由德国病理学家 Cohnhein 提出。1976 年 Friedenstein 等^[1]报道,应用贴壁法从骨髓中分离出某种单核细胞,发现这种单核细胞在一定的条件下可分化成为多种来源于中胚层的间充质干细胞(MSCs)如:骨、软骨、肌肉和脂肪细胞等,因而把这种细胞称为骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。它的含量在骨髓中最为丰富,随着研究的深入,近年来越来越多的骨髓以外的间充质干细胞陆续被人们发现,在脐血、外周血、卵黄囊、脾脏、肾脏、牙髓、肌肉、脂肪、羊膜及真皮组织中均有间充质干细胞的存在。因此很多学者认为这种具有多分化潜能的间充质干细胞广泛存在于多种器官间质及结缔组织中^[2-6]。

二、BMSCs 的分离培养及鉴定

1. BMSCs 的分离培养:BMSCs 是来源于骨髓的一种比较原始的骨髓基质细胞,是最易于分离的成体干细胞之一,但其含量较少,仅占骨髓中单个核细胞的 $1/10^6 \sim 1/10^5$,且年龄越大,数量越少^[7]。骨髓间充质干细胞的分离方法有多种,如全骨髓贴壁培养法、密度梯度离心法、免疫磁珠分选法、流式细胞仪分选法、培养板筛选法^[8-10]。目前国内最常用的方法为前两种。(1)全骨髓贴壁培养法:全骨髓贴壁培养法是利用了 BMSCs 易于贴壁生长的特性,由 Friedenstein 等^[1]在塑料培养皿上培养全骨髓标本时首次发现,经过后人在此基础上不断地改进,使得这种方法变得简单易行,即将收集到的全骨髓标本接种到塑料培养皿中 37°C 、5% CO_2 孵箱内培养 48h 后首次换液,以后每 3 天换 1 次液,以除去不贴壁的细胞,直至细胞长满至 80%~90% 时,按 1:3 进行传代培养,进一步纯化,扩增。(2)密度梯度离心法:密度梯度离心法是利用了 BMSCs 与其他细胞密度的差异实现的,通常方法是将要筛选的骨髓样品放在 Percoll 或

Ficoll 分离液表面进行密度梯度离心。不同密度的细胞会被分为不同的富集层,富集层内通常包含较高浓度的,能够被接种和扩增的 BMSCs,此种方法得到细胞形态均一,增殖较快,因此也是较为常用的分离技术之一。

2. BMSCs 的鉴定:在细胞表面表达的蛋白常被用来鉴定各种不同类型的细胞,这些细胞表面分子在各种同型或异型细胞之间的相互作用中具有重要意义。BMSCs 是一种成体干细胞,目前尚没有一种特异的标志物能够识别它,通过对 BMSCs 表面分子的大量研究,发现表达为阳性的表面分子有:CD9、CD29、CD44、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD54、CD56、CD58、CD61、CD62L、CD71、CD73、CD90、CD102、CD104、CD105、CD106、CD124、CD166^[11,12]。表达阴性的表面分子有:CD1a、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD15、CD18、CD25、CD34、CD51、CD62E、CD62P、CD80、CD83、CD86、CD144^[13]。BMSCs 不表达内皮细胞特征性的标志分子 CD31,造血细胞的表面分子 CD14、CD34、CD45 也为阴性。1991 年 Simmoms 首次报道他们鉴别了 BMSCs 的抗体 STRO-1,目前较为公认的 BMSCs 的表型分子为:SH2(CD105, 内皮糖蛋白)、SH3(CDD166, 白细胞活化黏附分子)和 SH4(CD73, 5'-核苷酸酶),但是否表达 CD123、CD120、CD127 及 HLA-ABC 等分子,科学界尚未达成共识。

三、BMSCs 的生物学及免疫学特性

1. BMSCs 的生物学特性:BMSCs 来源于中胚层,具有强大的增殖能力及多向分化潜能,原代培养 BMSCs 时,标本中混有脂肪细胞、红细胞等杂质细胞,培养 48h 后 BMSCs 基本完成贴壁,其余杂质细胞随着换液次数的增加逐渐被清除。早期 BMSCs 呈成纤维细胞样,体积较大,为长梭形,培养第 10 天时,细胞彼此融合,增长迅速,排列呈旋涡状,具有方向性;传代后,细胞形态更为均一,呈克隆样生长,以梭形细胞为主;这些细胞在经过 20~30 个培养周期后仍保持着多向分化潜能,这是 BMSCs 一个重要的生物学特

性^[14]。

2. BMSCs 的免疫学特性:随着人们对 BMSCs 的深入研究,它的免疫学特性逐渐引起了免疫学家及移植专家的关注,已成为目前间充质干细胞研究领域的又一热点。Bartholomew 等^[15]给接受异基因皮肤移植狒狒输注间充质干细胞后发现可以显著延长异基因皮肤移植物的存活时间。另外,大量研究表明,BMSCs 具有调节免疫细胞的功能,包括 T 细胞,B 细胞,自然杀伤细胞,单核-吞噬细胞,树突状细胞,中性粒细胞^[16]。BMSCs 这种免疫学特性大大丰富了其临床应用的范围,也为其辅助治疗骨髓移植、器官移植及自身免疫系统疾病提供了理论依据。(1)BMSCs 的低免疫原性:2003 年 Tse 等^[17]将间充质干细胞与异基因外周血单个核细胞或同种异体 T 淋巴细胞共培养后不能引起同种异体 T 淋巴细胞显著增殖,说明 BMSCs 具有低免疫原性和较低的抗原呈递能力。有学者研究表明,间充质干细胞不表达 MHC-II 类分子和 FasL,不表达共刺激分子 B7-1、B7-2,低水平表达或不表达 MHC-I 类分子、CD40 和 CD40L,进一步证明了 BMSCs 的低免疫原性和较低的抗原呈递能力。(2)BMSCs 对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用:研究表明,BMSCs 能够抑制混合淋巴细胞反应 (MLR) 中或丝裂原 PHA 刺激引起的 T 淋巴细胞的增殖。在 MLR 反应的初始阶段或反应中段加入 BMSCs,均能够抑制正在进行中的 MLR,使 T 淋巴细胞增殖能力显著下降,而且 BMSCs 还能够抑制抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体刺激引起的 T 淋巴细胞的增殖反应。Krampera 等^[18]采用小鼠雄性移植抗原 HY 激发免疫反应的方法,研究了 BMSCs 对静息 T 淋巴细胞和记忆性 T 淋巴细胞的免疫应答反应的影响,结果表明在 BMSCs 作用下,静息 T 淋巴细胞核记忆性 T 淋巴细胞对 HY 肽的增殖反应、细胞毒反应、以及能产生 INF- γ 的 T 淋巴细胞数量都受到了抑制,且这种抑制作用是剂量依赖性的。此外有研究还表明,BMSCs 的免疫抑制作用不需要 MHC 分子、抗原呈递细胞或 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞的参与。(3)BMSCs 在宿主内存活并诱导免疫耐受:Fandrich 等^[19]报道,骨髓干细胞移植后,受者体内可通过形成稳定的造血系统的嵌合状态诱导对供者移植物的特异性耐受,从而为诱导特异性的免疫耐受提供了一条新的途径。有学者将 BMSCs 移植到同基因或异基因宿主内存活数月后在肝、肾、脾、肺、胸腺、胃肠道和皮肤中都检测到了 BMSCs 的存在,可能原因是 BMSCs 及

其组织表达的黏附分子的不同而迁移到不同的组织并在其中停留,提示 BMSCs 具有多个组织器官归巢能力^[20]。Saito 等将 C57BL/6 小鼠来源的 BMSCs 移植到具有免疫功能的大鼠体内,1 周后结扎冠状动脉,并在不同时间点观察移植细胞的存活情况,发现这些 BMSCs 能够在异种环境中存活并具有向损伤部位迁移和形成心肌细胞的能力。以上研究表明,移植的 BMSCs 在受体内广泛分布并存活,因此有学者推测其机制可能为 BMSCs 诱导了对相同供着来源的组织器官的耐受。

四、BMSCs 促进难愈性创面愈合的临床与实验研究

在临床治疗中发现,各种原因导致的创面若伴有骨质、肌肉、肌腱及神经等重要组织的损伤,虽经积极治疗,仍有部分创面经久不愈,给患者带来了极大的痛苦和沉重的负担。治疗难愈性创面的第 1 步就是要修复这些创面中受损伤的重要组织并恢复其原有功能。Shumakov 等利用 40 只 Wister 小鼠分别观察了自体或异体 BMSCs 在深度烧伤创面治疗中的作用,结果发现,移植了 BMSCs 组的组织重建修复更为活跃,能使烧伤面积迅速减少。Chong 等把 BMSCs 注入到兔韧带损伤模型中,发现损伤处肌腱的胶原纤维排列更为整齐,网格更为致密,提示 BMSCs 能显著提高韧带的生物性能,从而促进损伤后肌腱功能的恢复。Polisetty 等成功在体外特殊的微环境下将 BMSCs 诱导分化成角膜缘干细胞 (LSC)。Reyes 等体外诱导 BMSCs 分化成肌细胞,把 BMSCs 移植到肌营养不良 (mdx) 小鼠肌肉中后,检测到了肌营养不良蛋白阳性的纤维的表达,而此种蛋白并不在 mdx 小鼠肌肉中表达,提示 BMSCs 可以向肌源方向分化并有治疗肌肉疾病的潜能。Sun 等在实验研究中发现,BMSCs 移植可以减轻大鼠肝纤维化,后来这个发现在造血干细胞移植的病人身上得到证实。Kwon 等将 BMSCs 注入到糖尿病大鼠体内,并发现 BMSCs 可以加速糖尿病大鼠创面的愈合。在对动物的研究中发现 BMSCs 不仅可以加速创面愈合,改善皮肤修复的质量,还可以促进修复区血管和上皮组织的再生。Sostak 等研究发现,用 Y 染色体标记后的 BMSCs 移植到女性大脑后,移植 3 个月内在受体大脑及小脑中均检测到了 Y 染色体阳性的细胞表型,证明,BMSCs 移植后可以迁移到大脑并产生新的神经细胞。Coel 等将自体 BMSCs 经皮下注入到 20 例胫骨骨不连接患者后,发现有 15 例达到了骨性愈合,平均愈合周期

仅 14 周。Cancedda 等的研究报道也证实了自体 BMSCs 移植可以治疗较大范围的骨不连接、骨质缺损。

五、存在的问题与展望

BMSCs 易于获得,在体外容易分离培养,具有较高的分化潜能,且凭借其低免疫原性的特点可以避免免疫排斥的发生。其良好的治疗作用和少见的不良反应,更大大扩展了其在临床及实验研究中的应用价值,是组织工程、基因工程、细胞疗法及再生医学领域的研究热点之一。但现今对 BMSCs 的研究仍然面临几个亟待解决的问题:①BMSCs 在骨髓中的含量较低,培养周期较长,如何实现快速和大规模的扩增还有待于进一步的研究;②BMSCs 没有特异的细胞表面标志分子,目前对其的准确鉴别,科学界尚未达成一致;③已知 BMSCs 具有多种分化潜能,但其具体的分化机制及分化能力还不完全清楚;④目前 BMSCs 在临床应用中的适应证还无统一标准;⑤BMSCs 本身具有致瘤性,如何消除这种致瘤性,仍需进一步的研究;⑥BMSCs 具有一定的免疫抑制作用,且这种作用是非特异性的,移植后是否会增加受体的感染概率尚未阐明。

如何安全有效的将 BMSCs 应用于临床还有待于更多的学者进一步完善对 BMSCs 的研究。

参考文献

- 1 Friendentein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267 - 272
- 2 Lu X, Alshemali S, de Wynter EA, *et al.* Mesenchymal stem cells from CD34(-) human umbilical cord blood[J]. *Transfus Med*, 2010, 20(3): 178 - 184
- 3 Smiler D, Soltan M, Albitar M. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration[J]. *Implant Dent*, 2008, 17(3): 236 - 247
- 4 Rodriguez LF, Moraleda JM. Mesenchymal dental pulp stem cells; a new tool in sinus lift[J]. *J Craniofac Surg*, 2011, 22(2): 774 - 775
- 5 Song HY, Jeon ES, Kim JI. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue - derived mesenchymal stem cells[J]. *J Ceu Biochem*, 2007, 101(5): 1238 - 1251
- 6 Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, *et al.* The amniotic membrane as a source of stem cells[J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(1): 91 - 98
- 7 Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications

and biological characterization[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 568 - 584

- 8 Pountos I, Corscadden D, Emery P. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application[J]. *Injury*, 2007, 38(1): 23 - 33
- 9 Taylor SE, Cleqq PD. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells[J]. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2011, 27(2): 263 - 274
- 10 Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL. Isolation and characterization of size - sieved stem cells from human bone marrow[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(3): 249 - 258
- 11 Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(4): 436 - 448
- 12 Lee RH, Kim B, Choi HS, *et al.* Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(4 - 6): 311 - 324
- 13 Montesinos JJ, Flores - Figueroa E, Castillo - Medina S, *et al.* Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural expression[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(2): 163 - 176
- 14 Han SK, Chun KW, Gye MS. The effect of human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts on angiogenesis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117(3): 829 - 835
- 15 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(1): 42 - 48
- 16 Michelle M, Thomas R, Rhodri C, *et al.* Mesenchymal stem cell effects on T - cell effector pathways[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2011, 2(4): 34
- 17 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
- 18 Krampera M, Glennie S, Dyson J, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen - specific T cells to their cognate peptide[J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3722 - 3729
- 19 Fandrich F, Lin X, Chai GX, *et al.* Preimplantation - stage stem cells induce long - term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning[J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 171 - 178
- 20 Devine SM, Cobbs C, Jennings M, *et al.* Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissue following systemic infusion into nonhuman primates[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2999 - 3001

(收稿日期:2013 - 04 - 15)

(修回日期:2013 - 05 - 07)