

- tocilizumab and other biologic agents in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to disease – modifying antirheumatic drugs[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2010,39(6):425–441
- 10 Feist E, Burmester GR. Is tocilizumab in combination with traditional DMARDs safe and effective for patients with active RA? [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2009, 5(3):128–129
 - 11 Lebre MC, Vergunst CE, Choi IY, *et al.* Why CCR2 and CCR5 blockade failed and why CCR1 blockade might still be effective in the treatment of rheumatoid arthritis? [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21772
 - 12 Vincent FB, Saulep – Easton D, Figgett WA, *et al.* The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3): 203–215
 - 13 Liu J, Merritt JR. Chemokine receptor small molecule antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis and other diseases: a current view [J]. *Curr Top Med Chem*, 2010,10(13):1250–1267
 - 14 Magyari L, Varszegi D, Kovessi E, *et al.* Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications[J]. *World J Orthop*, 2014,18;5(4):516–536
 - 15 Song GG, Bae SC, Kim JH, *et al.* Interleukin – 4, interleukin – 4 receptor, and interleukin – 18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta – analysis[J]. *Immunol Invest*, 2013,42(6):455–469
 - 16 Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MC. IL – 18 in inflammatory and autoimmune disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013,70(24):4795–4808
 - 17 Nair BC, Vallabhaneni S, Tekmal RR, *et al.* Roscovitine confers tumor suppressive effect on therapy – resistant breast tumor cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2011,13(3):R80
 - 18 Westra J, Molema G, Kallenberg CG. Hypoxia – inducible factor – 1 as regulator of angiogenesis in rheumatoid arthritis – therapeutic implications[J]. *Curr Med Chem*, 2010,17(3):254–263
 - 19 Roman – blas JA, Jimenez SA. NF – kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Osteo Arthritis Cartilage*, 2006,14(9):839–848
 - 20 Gotoh Y, Nagata H, Kase H, *et al.* A homogeneous time – resolved fluorescence – based high – throughput screening system for discovery of inhibitors of IKK beta – NEMO interaction [J]. *Anal Biochem*, 2010,405(1):19–27
 - 21 Hoek RM, de LD, Kop EN, *et al.* Deletion of either CD55 or CD97 ameliorates arthritis in mouse models[J]. *Arthritis Rheum*, 2010,62(4):1036–1042

(收稿日期:2014 – 11 – 10)

(修回日期:2014 – 11 – 28)

滑膜间充质干细胞在软骨修复领域的研究进展

郑伟伟 杨 民

摘 要 自 2001 年发现以来,人们对滑膜间充质干细胞(SMSC)的研究已有十多年,在 MSCs 家族中,SMSC 在骨骼肌系统的治疗和再生方面最具前景,尤其在软骨再生方面。由于具有比骨髓、脂肪、肌肉等来源的 MSC 具有更强自我增殖能力和成软骨能力,滑膜间充质干细胞在未来有可能成为软骨修复领域的种子细胞。本文主要对近年来滑膜间充质干细胞在软骨修复领域的应用及其研究进展进行综述。

关键词 滑膜间充质干细胞 组织修复 软骨 种子细胞

中图分类号 Q254;R329.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.048

关节软骨是一种透明软骨,由特殊的致密结缔组织胶原纤维构成基本框架,在这些纤维之间,散在分布着软骨细胞,而这些软骨细胞的功能则是维持关节软骨的正常代谢。关节软骨承受力学负荷,没有神经、血管支配,一旦损伤后难以自行修复。目前软骨修复的治疗主要是自体软骨移植,但其来源有限,不能用于广泛修复。间充质干细胞的出现为再生组织工程提供了新了视野。研究证实,滑膜间充质干细胞(synovial mesenchymal stem cells,SMSC)较其他来源

的间充质干细胞具有更强的成软骨能力^[1],越来越引起人们的重视。

一、SMSCs 的来源及形态学特征

滑膜组织中间充质干细胞含量丰富,仅需少量滑膜即可收集 SMSC,研究表明,将滑膜组织移种到培养皿中培养两周后,1mg 滑膜组织可收集到 21000 个细胞^[1]。滑膜组织除可在健康人体内获取外,类风湿关节炎(RA)或退行性骨关节病(OA)患者也可成为其来源,并且滑膜组织可再生,可通过关节镜获取。

相差显微镜下,SMSC 呈均一的小梭形细胞状,胰酶消化后细胞直径为 10~15μm,细胞核较大,圆形,有明显的核仁。低密度培养时细胞呈纤维细胞

作者单位:241001 芜湖,皖南医学院弋矶山医创伤骨科

通讯作者:杨民,电子信箱:82646373@qq.com

样。SMSC 体外培养分为动态培养和静态培养,与静态培养相比,动态培养在更短的间内可分离出更多的 SMSC,但其缺点是可能会夹杂其他间充质干细胞^[2]。根据形态,滑膜细胞主要分两种:巨噬细胞样细胞和成纤维细胞样细胞^[3]。巨噬细胞样细胞可能与先天性获得性免疫有关,成纤维细胞样细胞则产生滑液。SMSC 来源于成纤维细胞样细胞^[4]。实验发现成纤维细胞样细胞增殖能力较强,培养两周后细胞群中几乎全部都是 B 型细胞。

二、SMSC 的生物学特征及免疫表型

SMSC 做为成体干细胞的一种,具有自我增殖能力和多向分化潜能。SMSC 在体外传至 10 代以上仍保持良好的生长状态,属稳定传代的细胞系^[5]。SMSC 可向成脂、成骨、成软骨、成肌腱纤维分化,尤其是向软骨分化方面更具潜力。

SMSC 免疫表型与 BMSC 相似,均表达 CD10、CD13、CD14、CD34、CD44、CD45、CD49a、CD62e、CD73 的表达均为阳性;但第 1 代细胞 CD14、CD34、CD45、CD62e 和 HLA-DRA 表达为阴性^[6]。张正政等^[7]研究发现人第 2~6 代 SMSC 具有相似的免疫表型,均表达 CD90、CD44、CD105,不表达造血细胞表面抗原 CD34、CD45。此外 SMSC 均不表达 HLA-DR 以及 CD14。但以上研究并未发现 SMSC 的特异性标志物。

三、SMSC 向软骨分化的优势

Yoshimura 等^[5]通过比较肌肉、脂肪、滑膜、骨髓和骨髓来源的间充质干细胞,发现 SMSC 较其他间充质干细胞具有更强的增殖能力,在向软骨分化的能力上,SMSC 也明显优于其他间充质干细胞。并且,滑膜细胞和软骨细胞均来源于共同的祖细胞群,当关节软骨存在部分缺失时,邻近的滑膜组织会向缺损处生长覆盖,有助于软骨修复。另外,MSC 体外培养后具有免疫抑制效应,可用于 MSC 的同种异体移植^[8]。

四、SMSC 与诱导因子

近年来的研究显示,转化生长因子(TGF- β)超家族、骨形成发生蛋白(BMP)家族、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胰岛素生长因子(IGF-1)等均能促进 SMSC 增殖和向软骨细胞分化,其中 TGF- β 和 BMP-2 协同促进 SMSC 成软骨的作用尤为突出^[9]。有研究表明,Rho A/Rho 激酶通路的激活调控了 TGF- β 诱导的软骨细胞相关蛋白的转录和细胞骨架结构的形成,这一发现对于体外诱导 SMSC 分化为软骨细胞具有重要指导作用^[10]。此外,Kim 等^[11]认为 TGF- β 1 可上调软骨细胞基因表达是通过增强

Sox9 基因的表达,他们将 TGF- β 1 通过重组反转录病毒转染入 SMSC,转染后的 SMSC 持续表达 TGF- β 1,通过流式和 RT-PCR 证实过量的表达的 TGF- β 1 不能引起细胞表面发生改变。在体外诱导成软骨,发现持续表达的 TGF- β 1 不但增强了 SMSC 增殖能力还提高了 SMSC 成软骨能力。

除生长因子外,培养基中的离子含量也影响着间充质干细胞的增殖及向软骨组织分化。Dry 等^[12]通过研究发现,适当提高培养基中的 Ca^{2+} ,可提高 SMSC 增殖率,但不能促进其向成骨、成软骨、成脂方向分化。然而,在 $\text{Ca}^{2+} > 1.8\text{mmol/L}$ 时,兔的 BMSC 增殖率不受其影响^[13]。当 $\text{Ca}^{2+} > 0.6\text{mmol/L}$ 时, Ca^{2+} 对小鼠神经前体细胞的增殖不产生影响^[14]。 $\text{Ca}^{2+} < 5.0\text{mmol/L}$ 时,其对猪成骨细胞增殖率无影响,但 $\text{Ca}^{2+} > 5.0\text{mmol/L}$ 时起抑制作用^[15]。但与当前研究相反的是,人类 ADSC 在 $\text{Ca}^{2+} < 0.9\text{mmol/L}$ 时,表现出增强的生长态势^[16]。尽管多项研究表明 Ca^{2+} 可以增强很多哺乳动物细胞的生长速率,但 Ca^{2+} 对细胞的影响并不一致,这可能与细胞的类型和细胞来源有关。

此外,软骨细胞上清液也可诱导 SMSC 的成软骨分化。邵博等^[17]通过将软骨细胞上清液加入微团培养的 SMSC 管中,微团培养 21 天后可见软骨样组织,免疫组化、real time-PCR 检测结果显示诱导后的微团表达 II 型胶原蛋白和蛋白聚糖,诱导的产生可能与软骨细胞分泌的一些细胞因子有关。

五、SMSC 与载体材料

将 SMSC 种入材料上固定在软骨缺损部位,从而促进软骨细胞和基质的生成。然而,植入材料修复与天然组织相比仍具有较大的差异。软骨基质富含 II 型胶原蛋白和硫酸糖胺聚糖,SMSC 通过诱导能合成大量的软骨基质。将 SMSC 种植在含有纤维蛋白凝胶的聚乙醇酸网中培养 1 个月,产生了大量软骨细胞特异性的 II 型胶原蛋白和硫酸糖胺聚糖^[18]。

Chang 等^[19]发现将人的 SMSC 与人脱细胞关节软骨基质(ACM)混合培养,通过 RT-PCR 发现 ACM 单独可诱导 SMSC 表达 II 型胶原,加入诱导因子的 ACM 可改善 SMSC 成软骨后的过度增殖导致再生组织肥大等问题。ACM 可成为软骨组织工程的载体材料,这一发现可能为 SMSC 种入体内过度增殖而引起再生组织肥大等问题提供解决思路。Pei 等^[20]通过研究发现 SMSC 来源的去细胞基质(DSCM)不但可以在体内、体外促进 SMSC 增殖,还可以促进细胞向软

骨细胞分化。此外,富血小板血浆(PRP)也可成为软骨缺损的组织工程支架, Lee 等^[21]将 SMSC 植入 PRP 内,种入兔软骨缺损模型,24 周后成功修复兔软骨缺损模型。但 Lee 等^[22]通过研究发现富血小板血浆(PRP)对 SMSC 三系分化起着负面作用,并证实 PRP 单独应用不能诱导 SMSC 分化。而 Elder 等^[23]也证实,PRP 单独应用不能促进骨髓间充质干细胞成软骨。

Lee 等^[24]将 SMSC 植入 I 型胶原/透明质酸/纤维蛋白原(COL/HA/FG)复合凝胶中,注射入兔膝关节软骨缺损模型中,24 周后通过番红 O 和免疫组化染色复合凝胶产生透明软骨结构,这项研究表明 I 型胶原/透明质酸/纤维蛋白原(COL/HA/FG)复合凝胶是一个很好的用于修复软骨缺损的材料。Shao 等通过噬菌体展示技术证实了一个含有 7 个氨基酸的肽序列与 SMSC 具有很高的亲和力,他们将这种肽序列通过共价偶联结合聚己内酯电纺网格和人类脱钙骨支架材料表面,将其与 SMSC 共培养 24h,发现实验组中的 SMSC 数量较对照组有明显增加,这项研究广泛适用于 SMSC 为种子细胞的组织工程。

尽管通过 MSC 进行体内修复已达到可接受的临床效果,但修复后的组织相较于天然组织而言,其机械性仍然较差^[25]。将种子细胞诱导成为与正常软骨组织相当的工程组织尚需时日。种子细胞的过度增殖是再生组织工程经常遇到的问题,在缺损部位植入更多的细胞会收到更好的效果,因为有些细胞会被吸收或不能分化。将人的 SMSC 种植在人脱细胞关节软骨基质(ACM)诱导成软骨也可降低细胞过度增殖导致再生软骨肥大等问题^[19]。

六、SMSC 与相关疾病

在半月板修复中, Moriquchi 等将高密度的猪滑膜间充质干细胞在抗坏血酸的培养液中,通过悬浮培养构建了细胞三维支架(TEC),将 MSC 植入 TEC 再固定在半月板缺损处,6 个月后材料整合到相邻半月板内。证实 SMSC 衍生的 TEC 可以成为一种修复半月板缺损的再生载体材料。另外,有研究证实,源于滑膜的成纤维细胞能通过迁移增殖和分化对半月板修复进行调节。

在骨关节炎(OA)和类风湿关节炎(RA)模型中, Ryu 等将 SMSC 于硝普钠刺激的软骨细胞(RA 或 OA 模型)共培养,发现共培养后能促进软骨细胞的生长,此外共培养后细胞能产生胰岛素生长因子(IGF-1),抑制炎症因子(NO、IL-6、CCL2/MCP-1 和 CCL3/MIP-1 α)的产生。在肌腱、韧带的修复领域,

SMSC 较其他 MSC 在肌腱纤维分化的能力上有明显优势。

七、展 望

尽管在 SMSC 的体外增殖、多向分化潜能、免疫特性等方面已有了广泛的研究,但目前还有许多尚未解决的问题,未能筛选出 SMSC 表面特异性的标志分子。对于 SMSC 的鉴定缺乏公认统一的标准,软骨分化的相关研究多局限于体外试验和动物试验,仍存在很多不足,如未找到理想的 SMSC 支架材料、种植材料的过度增殖和血管翳形成等等问题尚需要完善。此外,由于 MSC 体外培养后具有免疫抑制效应,可能存在潜在的激发恶性肿瘤的风险,也给再生组织工程提出了更深层次的难题。

由于 SMSC 具有明显的可塑性、容易获取、体外增殖能力强、来源不受患者年龄限制以及免疫调节、免疫原性弱等诸多优点,被视为一种很有前景的种子细胞和生物治疗药物。因此,SMSC 已取代 BMSC 成为软骨组织工程最有潜力的种子细胞,改进细胞三维支架,改进诱导方法,提高细胞诱导效率,诱导出接近人体正常软骨的组织工程软骨是目前研究的重要任务之一。

参考文献

- 1 Sakauchi Y, Sekiya I, Yagishita K, *et al.* Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues; superiority of synovium as a cell source[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52:2521-2529
- 2 Santhakumaran A, Dos Santos F, Madeira C, *et al.* Isolation and ex vivo expansion of synovial mesenchymal stromal cells for cartilage repair[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(4):440-453
- 3 Edwards JC. The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation[J]. *J Anat*, 1994, 184: 493-501
- 4 Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V, *et al.* Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63: 1289-1300
- 5 Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, *et al.* Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle[J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 327(3): 449-462
- 6 de Bari C, Dell'Accio F, Karystinou A, *et al.* A biomarker based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2):501-510
- 7 张正政,李卫平,杨睿,等.滑膜间充质干细胞分离培养、免疫表型鉴定及在混合淋巴反应体系中的抑制效应[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(19):3515-3519
- 8 Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2:8

- 9 Rui YF, Du L, Wang Y, *et al.* Bone morphogenetic protein2 promotes transforming growth factor beta3 induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium derived stem cells[J]. Chin Med J:Engl, 2010, 123(21):3040-3048
- 10 Xu T, Wu M, Fang J, *et al.* Rho A/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the smad pathway[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(5):1119-1125
- 11 Kim Y, Ryu JS, Yeo JE, *et al.* Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(4):1593-1599
- 12 Drv H, Jorgenson K, Ando W, *et al.* Effect of calcium on the proliferation kinetics of synovium-derived mesenchymal stromal cells[J]. Cytotherapy, 2013, 15(7):805-819
- 13 Liu Y, Lu QZ, Pei R, *et al.* The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering[J]. Biomed Mater, 2009, 4:25004
- 14 Milosevic J, Juch F, Storch A, *et al.* Low extracellular calcium is sufficient for survival and proliferation of murine mesencephalic neural precursor cells[J]. Cell Tissue Res, 2006, 324:377e84
- 15 Eklou-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, *et al.* Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro[J]. Cell Tissue Res, 1998, 292:163e71
- 16 Lin T, Tsai JL, Lin SD, *et al.* Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14:92e102
- 17 邵博, 龚忠诚, 刘慧, 等. 软骨细胞上清液诱导滑膜间充质干细胞微团培养成软骨[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1):100-105
- 18 Pei M, He F, Boyce BM, *et al.* Repair of full-thickness femoral condylecartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissueconstructs[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17:714-722
- 19 Chang CH, Chen CC, Liao CH, *et al.* Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(7):2248-2257
- 20 Pei M, He F, Li J, *et al.* Repair of large animal partial-thickness cartilage defects through intraarticular injection of matrix-rejuvenated synovium-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(9-10):1144-1154
- 21 Lee JC, Min HJ, Park HJ, *et al.* Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model[J]. Arthroscopy, 2013, 29(6):1034-1046
- 22 Lee JK, Lee S, Han SA, *et al.* The effect of platelet-rich plasma on the differentiation of synovium-derived mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2014, 32(10):1317-1325
- 23 Elder S, Thomason J. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture[J]. Open Orthop J, 2014, 8:78-84
- 24 Lee JC, Lee SY, Min HJ, *et al.* Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(19-20):2173-2186
- 25 Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, *et al.* Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint[J]. Rheumatology:Oxford, 2003, 42(1):162-165

(收稿日期:2014-11-17)

(修回日期:2014-12-02)

糖尿病肾病与 ADPN、TGF- β 1、Collagen IV、ICAM-1 关系的研究进展

郭文荣 李 兴

摘 要 调查发现,中国成年人糖尿病发生率为 11.6%,约有 1.139 亿为糖尿病患者。糖尿病肾病是糖尿病最常见的微血管并发症及主要死因之一。目前,尚无有效措施阻止糖尿病肾病的发生及发展。近年来,细胞因子在糖尿病肾病发生、发展中的作用越来越受关注,现阐述糖尿病肾脏病变与脂联素、TGF- β 1、ICAM-1、IV 型胶原蛋白的关系,为防治糖尿病肾病提供新的思路。

关键词 糖尿病肾病 脂联素 TGF- β 1 ICAM-1 IV 型胶原蛋白

中图分类号 R587

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.049

基金项目:山西省归国留学基金资助项目(2012088)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院内分泌科

通讯作者:李兴,主任医师,电子信箱:13503504180@163.com