

骨髓间质干细胞及分化成骨的分子机制

Bone marrow mesenchymal stem cells and its molecular mechanism of differentiation into osteoblasts

周国英, 胡军祥

ZHOU Guoying, HU Junxiang

关键词 骨细胞; 骨生成; 分子生物学 **Key words** Osteocytes; Osteogenesis; Molecular biology

骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)在骨髓中的含量极少,但其扩增能力很强,能诱导分化为多种间质组织,本文就 BMMSC 的生物学特性及其在骨损伤修复和造骨调控的作用机制进行综述。

1 骨髓间质干细胞的生物学特性

BMMSC 具有自我复制能力和多向分化潜能。BMMSC 在不同的条件下能诱导分化为多个细胞系,包括成骨细胞、纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、内皮细胞及神经细胞,此外,还有 BMMSC 分化为肝细胞的报道^[1]。与 BMMSC 类似的具有多潜能成年(祖)细胞特性的间质干细胞能从外周血、脐血、胰腺^[2]、肾^[3]、肝^[4]、脂肪、肌肉和脑等多种器官组织通过分离培养的方法获得,而且这些细胞具有相同的形态表型和体外多向分化潜能,表达的基因图谱高度一致。一般情况, BMMSC 的自我复制能力以及增殖时间有限, Marubara 等^[5]用涂有 bmECM 的组织培养皿培养 BMMSC,发现 BMMSC 增长速率明显加快,增殖周期延长,细胞大量扩增,扩增的细胞是原来的 10^6 倍,而且扩增后的细胞同样具有多向分化潜能。

BMMSC 具有黏附特性。通常人们根据这一特性,通过细胞贴壁培养的方式进行体外分离^[6]。外源介质的介入对 BMMSC 贴壁有一定的改善作用, Bensa 等^[7]研究发现纤维蛋白支架结构利于人 BMMSC 的黏附、扩散和增殖,而且在形成纤维蛋白支架结构的纤维蛋白原浓度 18 mg/ml 和凝血酶活性 100 IU/ml 时效果最佳,但纤维蛋白支架结构只起引渡作用,而不为造骨诱导提供永久性的支持。

BMMSC 的表面抗原具有非专一性,其特异性标志物尚无确切定论。一般认为整合素家族成员 CD 29、黏附分子 CD 44、CD 166 以及 CD 105 等是 BMMSC 的重要标志物。不过, Quirici 等^[8]采用免疫磁性分离法以低亲和力 NGFR 抗体标注骨髓细胞可获得形态和功能都相似的细胞,即都能进行体外扩增,自我更新,分化为多种细胞和支持造血,这一发现为体外分离和鉴定 BMMSC 提供了又一个有效方法。

BMMSC 是细胞和基因治疗的理想靶细胞。BMMSC 易于外源基因的转染和表达,如逆转录病毒、腺病毒可介导多种外源目的基因整合到 BMMSC 基因组并长期表达, BMMSC

移植到体内后能定位于相应的组织,而且免疫原性较弱,表达组织相容性复合物 I 而缺乏组织相容性复合物 II^[9]。

BMMSC 是造血干细胞赖以生存的微环境的重要组成部分。BMMSC 及其分化细胞通过表达细胞因子受体和分泌一系列细胞因子,包括刺激因子(MCSF、IL-6、IL-11、IL-15、LIF 等)和抑制因子(MIP-2、TGF- β 、IFN- γ 、TNF- α 、MIP-1 α 、T β 4、CLM 等)^[10,11],以维持造血干细胞的造血功能和调控造血重建。BMMSC 分泌的细胞因子不但直接作用于造血细胞,也能作用于 BMMSC 本身,改变自身的增殖和分泌状态或诱导其他细胞因子生成^[12],从而间接调控造血。可见, BMMSC 结构和功能的完整性对于保持机体在生理状况尤其是应激状态时造血的稳定性具有十分重要的作用。

2 骨髓间质干细胞成骨作用的分子机制

BMMSC 成骨的调节因子包括多种生长因子、细胞因子和一些常用的添加剂,如地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C、抗坏血酸、1, 25-(OH)₂ 维生素 D₃ 等。

2.1 生长因子和细胞因子

2.1.1 BMPs BMPs 能促进 BMMSC 向成骨细胞分化,体现在能使碱性磷酸酶(ALP)的 mRNA 水平及活性增高,成骨细胞的标志物骨桥蛋白、骨钙素和 I 型胶原的 mRNA 水平及蛋白合成增加,同时抑制其向其他细胞如脂肪细胞或骨骼肌细胞分化,具有异位成骨能力。BMP 在体内的表达水平受其他因素调控,如 BMP 4 含量受细胞内磷酸盐(Pi)的浓度调节^[13]。转染 BMPs(如 BMP 2)基因的 BMMSC 形成新骨的能力更强^[14],进行异体移植的效果也一样^[15],而且是直接修复骨损伤,不仅仅是起传递 BMP 2 基因的作用。

BMP 7 能上调 Runx2/Cbfa1 基因在各种造骨细胞和间质干细胞中的表达,促进成骨形成。BMP 4、BMP 6、BMP 7 能通过增加 II 型胶原和蛋白聚糖的合成而促进软骨发生,但 BMPs 家族的其他成员对软骨或许具有负面效应^[16]。另外,通过比较 BMPs 和 TGF β s 发现 BMPs 在促进软骨发生的作用方面不及 TGF β 1^[17]。就像 TGF β 家族的其他成员一样, BMPs 通过结合特定 I 型和 II 型丝氨酸或苏氨酸激酶受体,形成受体复合物激活 Smads 通路实现信号转换^[18]。

2.1.2 TGF- β s TGF β s 能抑制 BMMSC 向脂肪细胞分化,而且对由糖皮质激素和 bFGF 所诱导的 BMMSC 向脂肪细胞分化也有抑制作用,加入无血清培养液中可诱导 BMMSC 形

成多层基质结构,表达软骨标志物 II 型胶原^[19]。TGF β s 无异位成骨能力,但它能增加 BMPs 诱导成骨的量,可上调纤联蛋白和 II 型胶原 mRNA 的表达而在 BMMSC 分化为软骨细胞过程中起至关重要的作用。

TGF 超家族也包括 2 个软骨特异性蛋白: 软骨诱导因子 A 和 B(CIF A 和 CIF B), 两者都能促进 BMMSC 分化为软骨细胞。其中 CIF-B 与 TGF β s 结构具有高度的同源性, CIF A 与 TGF β 1 作用类似。TGF β 1 的生物活性极其广泛,能促进关节软骨处的蛋白质合成、细胞增殖并抑制基质金属蛋白酶(MMPs)的活性,促进 BMMSC 分化为造骨细胞、破骨细胞和软骨细胞^[20],增加造骨细胞的矿化程度,表达成骨细胞的多钟标志物^[21],而且还能诱导多种组织来源的间质干细胞向软骨细胞分化,具有一定的趋化作用。

2.1.3 HGF、IGF 肝细胞生长因子(HGF)是一种多效性的细胞因子,单独或与其他诱导物(如 1, 25(OH)₂ 维生素 D₃)协同作用可促进 BMMSC 的成骨作用^[22]。其受体是跨膜酪氨酸激酶,能刺激多种细胞的增殖、迁移和形态分化,还能调节单核细胞巨噬细胞的功能,包括上调 HGF 受体,分泌 HGF 本身和其他细胞因子(如 IL-6, GM-CSF 和 G-CSF)等一系列复杂而整合的生物学反应。胰岛素样生长因子(IGF)以一种自分泌或旁分泌的形式调节 BMMSC、骨膜细胞、造骨细胞和软骨细胞的增殖和分化^[23,24],也是主要的骨生长调节因子。

2.1.4 ILs IL-6 能促进骨祖细胞的分化,但在缺少可溶性 IL-6R 时,IL-6 不具有这种诱导作用,而且这种情况不会因为加入 IL-6R 或 IL-6R/IL-6 复合物而得到逆转,然而,加入 DEX、IL-6R 或 IL-6R/IL-6 复合物可见到 ALP 活性的增加^[25]。这一效应表明 BMMSC 的成骨作用与 gp 130 活性具有相关性,IL-6R 的缺乏能保护 BMMSC 的干细胞特性,从而不会因为自身或其他间质细胞所产生的 IL-6 作用而分化为骨细胞。

另外,TNF、PDGF、EGF、FGF、VEGF 在调节 BMMSC 的成骨作用方面也都有不同程度的作用。

2.2 其他诱导物

2.2.1 DEX 地塞米松(DEX)被普遍认为是诱导 BMMSC 矿化时必须的,培养时加入 DEX 可与 BMMSC 上的糖皮质激素受体结合,激活细胞表面受体,促进 BMMSC 向软骨细胞分化。但 Schecroun 等^[26]研究指出 DEX 在培养液中的含量应该下调,而且在不含 DEX 的情况下继续培养同样有骨样结节的形成,这与 DEX 能抑制 TGF β 依赖性的大鼠造骨细胞胞外基质合成的说法相一致^[27]。对人体细胞而言,DEX 长期处理会抑制细胞的定位,影响细胞增殖速率和 I 型胶原的合成,从而抑制结节结构的形成。可见,骨样结节的形成取决于细胞的分化阶段,具有扩增能力的细胞比高度分化的细胞更易形成结节。

2.2.2 维生素 C、 β -甘油磷酸钠及 1, 25(OH)₂ 维生素 D₃ 维生素 C 的作用主要是促进体外培养的 BMMSC 合成胶原,形成钙化,同时调节 ALP 活性。 β -甘油磷酸钠可以提供骨组织在体外培养体系中发生沉淀所需的磷离子,从而加速结节的钙化。1, 25(OH)₂ 维生素 D₃ 在促进 BMMSC 向成骨细胞分化的同时,可抑制其向脂肪细胞转化,1, 25(OH)₂ 维生素

D₃ 和 TGF β 或 HGF^[22]协同作用都能促进人 BMMSC 的增殖和明显增强 ALP 的活性,促进其分化为成骨细胞,其中,1, 25(OH)₂ 维生素 D₃ 和 TGF β 协同作用促进人 BMMSC 成骨细胞的分化或许包括 IGFBP-3 的增加,但由于母亲在怀孕期间摄入蛋白质的量太少而造成的小孩造骨功能缺陷却不能因为加入 1, 25(OH)₂ 维生素 D₃ 和 IGF-1 等造骨诱导物而得到逆转^[28]。

2.2.3 E₂ 及抗坏血酸 雌激素(E₂)对骨量的维持有非常重要的作用,它能调节人 BMMSC 体外培养时骨的生长和 ALP 的表达,对造骨细胞的分化有促进或支持作用,只是对 ALP 的表达或维持或增加存在可变性^[29]。但金小岚等^[30]发现雌二醇能明显抑制 BMMSC 分化过程中造骨细胞分化和骨形成的重要转录因子 Cbfa1 mRNA 的表达,从而减少成骨细胞的生成,且呈剂量依赖性,ALP 活性和 I 型胶原的含量都随其浓度的增加而降低。可见,雌激素对 BMMSC 造骨功能的作用如何尚待进一步的研究。L-抗坏血酸可通过延长 I 型胶原转录因子的半衰期而最终增加 I 型胶原 mRNA 的含量。

根据 BMMSC 易于外援基因转染的特性,还可以转染相关调控因子基因(如 BMP-2 基因^[14,15], SOX 9 基因^[31]等)到 BMMSC,从而进一步增强其形成成骨细胞和软骨细胞的能力,以最大限度修复骨损伤,恢复其功能。此外,有些中药组分对 BMMSC 的成骨作用或许也有一定的诱导作用。

2.3 BMMSC 成骨的基质材料 Kim 等^[32]体外实验研究发现在 DEX 和抗坏血酸 2-磷酸盐(AsAP)诱导物和多孔 PLGA 支架结构存在的情况下培养 BMMSC,矿化程度明显比对照组高,可见到明显的钙沉积。Ge 等^[33]选择生物能分解的羟磷灰石角素聚合物作为造骨细胞暂时黏附、迁移、增殖和分化的基质,同样取得理想的治疗效果。同样,将体外扩增的 BMMSC 与基质材料协同移植比单纯移植基质材料的治疗效果明显提高^[34]。

3 结语

体外扩增的 BMMSC 或已诱导分化成骨的细胞与活性陶瓷、高分子材料、生物衍生材料等联合培养利于创伤或病理性骨组织的修复与重建,具有广阔的临床应用前景。不过,目前这方面研究的现状表明还存在一些问题:①促进 BMMSC 向骨细胞分化的诱导因子比较有限,而且有些诱导物的作用还有争议;②促进 BMMSC 成骨的理想基质材料还需要进一步的研究;③如何增加 BMMSC 成骨的量,抑制其向其他细胞分化的仍然是一个有待解决的问题。

参考文献

- 1 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, et al. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(4): 1110-1118.
- 2 Selander L, Edlund H. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mechanisms of Development*, 2002, 113(2): 189-192.
- 3 Almeida Porada G, Shabrawy DE, Porada C, et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(12): 1454-1462.

- 4 Ryden M, Dicker AG, Cothelstrom C, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell derived adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(2): 39F-397.
- 5 Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(3): 503-508.
- 6 周进明, 邹种敏, 郭朝华, 等. 小鼠骨髓间质干细胞的生物学特点及分化潜能鉴定. *第三军医大学学报*. 2002, 24(1): 58-61.
- 7 Bensa W, Triffitt JT, Blanchat C, et al. A biodegradable, brin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, 2003, 24(14): 2497-2502.
- 8 Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*, 2002, 30(7): 783-791.
- 9 Frandrich F, Lin X, Chai GX, et al. Preimplantation stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med*, 2002, 8(2): 17F-178.
- 10 La Mei C, Yan Y, Qi Ru W. Expression of hematopoietic inhibitory factors in mouse fibroblasts, macrophages and endothelial cells. *Cell Biology International*, 2003, 27(9): 739-745.
- 11 Hongying S, Nan L, Xiaojian W, et al. Molecular cloning and characterization of a novel cysteine-like molecule, CLM, from human bone marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(1): 176-182.
- 12 Solanilla A, Grosset C, Lemercier C, et al. Expression of flt3 ligand by the endothelial cell. *Leukemia*, 2000, 14(1): 153-162.
- 13 Goseki Sone M, Yamada A, Hamatani R, et al. Phosphate depletion enhances bone morphogenetic protein 4 gene expression in a cultured mouse marrow stromal cell line ST2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 299(3): 395-399.
- 14 Tsuda H, Wada T, Ito Y, et al. Efficient BMP-2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant A-derived viral Vector. *Mol Thera*, 2003, 7(3): 354-365.
- 15 Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*, 2003, 21(1): 44-53.
- 16 Kaps C, Bramlage C, Smolian H, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(1): 149-162.
- 17 van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, et al. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998, 6(5): 306-317.
- 18 Marrony S, Bassilana F, Seuwen IK, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces placental growth factor in mesenchymal stem cells. *Bone*, 2003, 33(3): 426-433.
- 19 Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in cartilage repair. *Clin Orthop Related Res*, 1999, 367: s156-s162.
- 20 Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells, induction of distinct mesenchymal lineages. *Cell Tissue Res*, 2002, 307(3): 32F-327.
- 21 Hai Z, Ahmad M, Gronowicz G. Effects of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials*, 2003, 24(12): 2013-2020.
- 22 Ippolito GD, Schiller PC, Perez stable C, et al. Cooperative actions of hepatocyte growth factor and 1, 25 dihydroxy vitamin D₃ in osteoblastic differentiation of human vertebral bone marrow stromal cells. *Bone*, 2002, 31(2): 269-275.
- 23 Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, et al. Expression of parathyroid hormone related peptide and insulin like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res*, 2003, 21(3): 51F-520.
- 24 Sakata T, Halloran BP, Elalieh HZ, et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin like growth factor I on bone formation. *Bone*, 2003, 32(6): 669-680.
- 25 Ericas A, Conget P, Rojas C, et al. gp130 activation by soluble interleukin 6 receptor/interleukin 6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2002, 280(1): 24-32.
- 26 Schecroun N, Delloye CH. Bone like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone*, 2003, 32(3): 252-260.
- 27 Chang DJ, Ji C, Kim KK, et al. Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor C/EBP1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem*, 1998, 273(9): 4892-4896.
- 28 Oreffo ROC, Lashbrooke B, Roach HI, et al. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*, 2003, 33(1): 100-107.
- 29 Holzer G, Einhorn TA, Robert JM. Estrogen regulation of growth and alkaline phosphatase expression by cultured human bone marrow stromal cells. *J Orthop Res*, 2002, 20(2): 281-288.
- 30 金小岚, 袁成良, 侯建红, 等. 雌二醇对骨髓基质细胞核结合因子 alpha 1 基因及成骨细胞生成的影响. *中国临床康复*, 2003, 7(11): 1626-1629.
- 31 Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, et al. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(2): 338-343.
- 32 Kim H, Kim HW, Suh H, et al. Sustained release of ascorbate 2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2003, 24(25): 467F-4679.
- 33 Ge Z, Bagnard S, Lim LY, et al. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials*, 2004, 25(6): 1049-1058.
- 34 Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1998, 16(2): 155-162.

(收稿日期: 2004-06-02 本文编辑: 李为农)