

干细胞共培养技术在医学研究中的应用

詹秀琴* 姜泽群

(南京中医药大学基础医学院, 南京 210023)

摘要 细胞共培养技术是20世纪70年代后期发展起来的将不同种类、不同来源的细胞在同一个体系中进行培养、增殖的技术, 该技术的诞生至今已经历了三十多年的时间, 在共培养的细胞种类、共培养条件、共培养方法等方面均取得了很大的进展。其中, 将骨髓间充质干细胞与其他种类细胞共培养, 以诱导骨髓间充质干细胞定向分化的研究最为常见。该文对在神经、骨关节、心血管等系统疾病的替代治疗中有重要价值的共培养研究——骨髓间充质干细胞与不同种类的体细胞共培养作了重点介绍, 以期今后的工作提供借鉴和帮助。

关键词 骨髓间充质干细胞; 细胞共培养; 医学研究

Cell Co-culture Technique in the Medical Research of Stem cells

Zhan Xiuqin*, Jiang Zequn

(School of Basic Medical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Cell co-culture technique was developed in 1970s. Different kinds and different sources of cells have been cultured in the same system. Great progress have been made in the cell species, conditions, methods of cell co-culture in the past thirty years. Among them, the bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with the other types of cells to be induced into different kinds of cells is the most common. This paper will focus on co-culture of bone mesenchymal stromal stem cells and different kinds of somatic cells, which have clear significance in the replacement therapy of nerve, bone, cardiovascular system disease, to provide reference and help for the future.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; cell co-culture; medical research

细胞培养指的是细胞在体外条件下的生长, 在培养的过程中细胞不再形成组织(动物)。细胞实验具有可直接观察活细胞的形态结构和生命活动、直接观察细胞的变化、易于提供大量生物性状相似的实验对象以及实验时间短、实验对象具均一性、相对于动物整体实验价格便宜等优点。但是, 在培养过程中虽然细胞生存于模拟的体内环境, 但该环境与真实的体内环境相比仍有很大差异, 尽管在培养基中加入了血清, 满足了细胞对某些生长因子的需要, 但该血清和特定细胞与在体内局部的体液环境

相比有很大的差异, 在这种条件下培养的细胞很可能不能代表体内细胞的真实状态, 因而细胞实验结果不能完全等同于在体实验结果。

此外, 人体内多数组织含有不止一种细胞, 组织中组成细胞的成分对组织的一般发育、维持内稳态以及修复反应是必不可少的。为了尽可能模拟自然条件下的细胞内环境, 从而使细胞间能相互沟通信息、相互支持生长增殖, 20世纪70年代后期, 人们在细胞培养技术的基础上发展出了细胞共培养技术。在共培养体系中, 两种或多种细胞在同一环境

收稿日期: 2014-01-23 接受日期: 2014-03-31

江苏省科技厅项目(批准号: BK20131417)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-85811930, E-mail: xqzhan14@sina.com

Received: January 23, 2014 Accepted: March 31, 2014

This work was supported by the Department of Science and Technology of Jiangsu Province (Grant No.BK20131417)

*Corresponding author. Tel: +86-25-85811930, E-mail: xqzhan14@sina.com

网络出版时间: 2014-07-21 10:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0027.html>

中成长, 它们很有可能互相交流和作用。事实证明, 共培养在试管内显示出强大的力量, 它阐明了正常生理情况、内稳态、修复及再生情况下细胞间的相互作用的重要性, 被广泛应用于现代细胞研究中。

首次共培养的实验研究是混合大鼠卵巢颗粒细胞和小鼠心肌细胞以研究异种细胞之间的间隙连接通信^[1], 主要关注细胞间的相互作用对卵母细胞成熟和胚胎植入前囊胚的影响。在之后的共培养研究中, 它被应用于研究细胞与细胞之间的通信。在这之后, 组织工程这一领域一经公认, 共培养就被引进到细胞间相互作用及其对组织形成影响的研究中。目前, 共培养技术已在多个研究方向受到重视, 在维持细胞的功能和活力、调控细胞增殖和分化、促进早期胚胎的发育以及提高代谢物产量等方面有广阔的应用前景^[2]。

1 共培养技术

细胞共培养方法主要分为两大类: 一是细胞与细胞直接接触式共培养。该方式适合体内邻近的组织细胞, 因在体内这部分细胞可通过封闭连接、锚定连接和通讯连接等细胞连接方式传递细胞因子和离子, 接触式培养可保留这些连接通讯, 使培养的细胞更接近体内自然状态; 二是细胞与细胞之间不直接接触, 而是通过培养基质内营养物质的交流来实现细胞之间的通讯, 从而使细胞拥有整体统一的环境。

在上述两种培养模式的基础上, 还开发出了一些为满足医学特殊需要或更接近体内状态的立体培养方法, 如采用脱细胞软骨生物支架材料与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)共培养作为骨组织修复材料, 以避免宿主免疫原性^[3]; 用多肽形成的纳米纤维三维支架培养巨噬细胞和心脏成纤维细胞的混合物, 以探讨高血压导致心脏纤维化的分子机制及防治策略^[4]。

2 共培养细胞体系种类

细胞共培养技术最早多应用于骨细胞和神经细胞, 但目前已扩展到更多种类的细胞。归纳起来, 常见的共培养细胞种类有: 干细胞和体细胞的共培养、不同种类的免疫细胞共培养^[5]、免疫细胞与体细胞共培养^[6-9]、骨细胞共培养^[10-11]、神经元和神经胶质细胞共培养^[12-13]以及不同来源的组织细胞共培

养^[14-15]等。

在上述共培养的细胞种类中, 干细胞和各种分化体细胞的共培养研究最为常见。在该种细胞共培养体系中, 干细胞可释放细胞因子作用于分化细胞, 为分化细胞提供营养, 分化细胞亦可通过与干细胞的直接或间接接触, 诱导干细胞向一定的方向分化。干细胞和分化细胞的共培养研究在骨组织和软骨组织的修复、血管重建、神经前体细胞的分化、糖尿病的缓解、肝肾组织的再生、肿瘤治疗等临床领域有着广泛的应用前景。

3 干细胞与体细胞共培养的应用

3.1 用于血管修复和再生

缺血性脑血管疾病中, 脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)的损伤是导致血脑屏障开放、脑水肿发生、从而加重神经元细胞损伤的重要因素。同时, 缺血半暗区血管的修复与新生也是挽救缺血受损神经元的关键。刘恺鸣等^[16]将大鼠BMECs和人BMSCs模拟缺血性脑血管疾病中BMECs所处的病理生理环境, 进行间接和直接共培养, 发现BMECs仅通过旁分泌细胞因子不足以诱导BMSCs分化, BMECs能够通过细胞直接接触诱导共培养的BMSCs向内皮分化。通过两种细胞的共培养, 他们还发现缺氧在诱导BMSCs向内皮分化的过程中起重要作用, 缺氧条件下直接共培养BMECs能诱导更多的BMSCs更彻底地向内皮分化, 为血管修复创造基础。

但也有研究发现, 非接触培养亦能有效促进BMSCs的分化。陆军等^[17]采用具有半透膜的细胞培养池结合6孔板的非接触共培养方式将人BMSCs和人脐静脉内皮细胞进行共培养, 发现BMSCs经人脐静脉内皮细胞诱导后能够表达内皮细胞特有的表面标志CD31和vWF, 并且可以在脱细胞牛颈静脉血管支架表面形成连续的单细胞层。这一结果说明, 与人脐静脉内皮细胞以非接触方式共培养后, BMSCs也能够很好地向内皮细胞分化。

上述研究结果由于细胞取材和培养条件不同, 结论不完全一致, 但都说明与单独培养相比较, 内皮细胞能促进BMSCs向内皮细胞分化, 这一结果为BMSCs作为人工血管和组织工程瓣膜的种子细胞提供了依据。

此外, 在间充质干细胞(mesenchymal stem cells,

MSCs)与内皮细胞共培养体系中, MSCs对内皮细胞的增殖和活力也发挥了正向调节作用。杨婧等^[18]将人脐静脉内皮细胞和成骨诱导的人胎盘MSCs复合种植于胶原水凝胶, 结果发现, 人脐静脉内皮细胞可在三维空间伸展、交织生长, 有明显的成血管倾向, 为解决骨缺损修复中组织工程骨的血管化问题提供了一个值得借鉴的方法。Zhang等^[19]的研究也证实了MSCs对内皮细胞的正向调节作用。他们发现, 在缺氧条件下, 与单独培养相比, 和BMSCs共育组的脐静脉内皮细胞成活率、迁移率和血管生成明显增加, 细胞凋亡率明显下降, 而且, 脐静脉内皮细胞表达的细胞因子SDF-1 α 、VEGF和IL-6的表达上调。分析其潜在的机制可能是BMSCs能分泌大量的细胞因子, 改善静脉内皮细胞的生存环境, 这一研究在股骨头坏死的治疗方面有很大借鉴作用。

通过对以上内皮细胞和MSCs共培养工作的分析发现, 实验观察对象均为单向性, 即仅对共培养体系中某一方细胞的生长状态进行比较观察, 但无论如何, 在共培养体系中不管是内皮细胞还是MSCs, 均受对方的直接或间接影响, 其生长状态与单独培养相比均发生了变化, 且缺氧亦是刺激内皮细胞和MSCs增殖、发育的一个重要因素。因此, 建议在今后的研究工作中, 在缺氧的条件下, 对共培养体系中的细胞群双方同时作分析比较, 更能全面地反映细胞的真实生存状态, 对后续的基础研究和临床研究的也更具指导意义。

3.2 关节和骨组织损伤修复

正常的关节软骨由于没有神经及血管组织, 其营养主要依靠弥散机制, 从滑膜分泌的滑液中摄取, 且关节软骨细胞代谢缓慢, 一旦发生缺损, 其愈合能力非常有限, 关节软骨损伤后的修复主要是细胞的反应性增殖, 但多数人认为这种机制并不能使受伤软骨完全修复, 一旦损伤发生即成为永久性病变。基于细胞治疗的软骨修复是一种很有前景的治疗方法, 但软骨细胞来源不足严重制约了其应用^[20-23]。以自体软骨细胞作为种子细胞, 取材部位受限, 软骨细胞增殖能力低, 传代培养容易引起老化和去分化。Tsuchiya等^[24]用人BMSCs与牛软骨细胞按不同比例混合进行共培养发现, 软骨细胞的增殖速度和细胞外基质的合成与BMSCs的比例呈正相关。因此, 共培养技术能够使软骨细胞快速增殖, 从而减少软骨细胞的用量, 且不必应用任何生长因子的诱导, 也避

免了为获取足够量的软骨细胞反复传代培养而引起的软骨细胞老化和去分化, 因此BMSCs和软骨细胞共培养对优化和扩大种子细胞源可能是一种实用的策略。

同样地, 人们也发现, 在共培养体系中软骨细胞亦能促进BMSCs向软骨细胞分化。Li等^[25]以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactide-co-glycolide, PLGA)为支架建立山羊BMSCs和软骨细胞共培养系统, 结果发现, 软骨细胞的存在可以促进BMSCs向软骨细胞分化, 但他们建立的另一种Transwell小室共培养体系中的BMSCs却被发现具有向成骨细胞分化的潜力, 而成骨方向分化潜能的存在会降低BMSCs向软骨细胞分化的能力, 但Thompson等^[26]的实验结果提出了一个解决这个问题的方案, 即共培养体系中若软骨细胞比例超过20%, 可以避免不希望的成骨分化。

进一步的在体研究也证明, BMSCs和软骨细胞的混合共培养物能促进软骨的修复功能。如冯万文等^[27]的研究发现, 置入青紫兰兔全层关节软骨缺损模型中的BMSCs和软骨细胞能够生长为软骨样缺损修复组织, 与周围软骨整合的软骨细胞植入后发育成熟, 修复组织与软骨下骨结合牢固, 说明BMSCs能促进软骨细胞基质合成, 缩短软骨细胞培养时间和减少传代次数, 有效修复关节软骨缺损。

除了能促进关节软骨的修复外, MSCs与其他细胞的共培养对关节韧带和椎间盘的修复也得到了逐步重视。有研究发现^[28-29], 与韧带成纤维细胞的间接共培养可以促进BMSCs向韧带成纤维细胞分化, 同时, BMSCs的I型、III型胶原蛋白和黏多糖的合成增加。说明BMSCs在韧带修复中也具有潜在的应用价值, 有望作为组织工程中韧带的种子细胞。

临床上还有一种常见的骨科疾病——椎间盘退变, 发病率很高。椎间盘退变的合理解决方法就是对退变的椎间盘进行生物学修复。椎间盘由外层的纤维环(annulus fibrosus, AF)、内部的髓核及上下终板构成。在椎间盘退变防治研究中, AF的生物学作用越来越受到人们的重视, 维持和修复AF的完整性有着重要的意义^[30]。张福勇等^[31]的研究发现, BMSCs与AF细胞共培养能够促进AF细胞增殖、增加II型胶原和蛋白多糖的含量, 为BMSCs治疗椎间盘退变的可能性提供了证据。

与其他细胞相比, 骨细胞相对封闭, 一般不参

与其他组织器官的代谢调节, 功能相对单一, 因此修复过程涉及因素较少, 与MSCs的共培养研究也相对比较成熟, 已经不仅仅停留在实验室的离体细胞培养水平, 其有效性更为在体实验所证实。可以预见, 随着细胞共培养技术的不断成熟, 将会在关节磨损、韧带损伤和椎间盘退变等骨科疾病的临床应用方面有着广阔的应用前景。

3.3 肝、肾等组织的修复和替代治疗

在干细胞和组织细胞的共培养体系中, 组织细胞可以促进干细胞的分化。如人骨髓来源多能成体祖细胞具有向肝细胞分化潜能^[32], 由于其取材方便, 可以来自患者自身, 无排斥反应, 具有重要的临床应用价值, 因而有望成为肝组织工程新的种子细胞来源, 为肝病患者的自体组织移植提供肝源。蒋泽生等^[33]将人骨髓来源多能成体祖细胞与人肝细胞系L02在体外直接混合后共培养, 5 d后即可成功被诱导向成熟肝样细胞定向分化, 提示我们通过细胞共培养技术有望在短时间内满足临床治疗数量级的需求。

药物所致的急性肾损伤是急性肾衰竭的主要原因之一, 其中化疗药物如顺铂等所致的肾损伤在临床工作中更为常见。王骏等^[34]将BMSCs与顺铂损伤后的肾小管上皮细胞(human kidney epithelial cells, HKCs)在体外进行直接共培养与间接共培养, 发现在两种培养模式下, HKCs数量均明显增高, 而HKCs的凋亡百分率亦均明显降低。在直接共培养组中, BMSCs还可通过转分化而转变为HKCs, 而在间接共培养组中BMSCs不能直接转分化为HKCs, 但能通过分泌细胞因子而发挥对HKCs的保护作用。Togel等^[35]也发现, 急性肾衰小鼠注入BMSCs后虽然其肾功能较对照组明显改善, 但BMSCs也没有转化为HKCs。温静等^[36]将肾组织干细胞(kidney stem cells, KSCs)和损伤的HKCs以Transwell小室的方法进行非接触式共培养, 结果也说明了KSCs能以分泌细胞因子的方式实现对HKCs的保护作用。

Hess等^[37]在胰腺再生的小鼠模型中发现, MSCs能够通过产生细胞因子的方式促进胰腺的再生。Galli等^[38]在MSCs对于心肌细胞保护作用的研究中也发现, MSCs能够通过分泌bFGF及HGF而促进心肌血管的再生及促进心肌细胞的增殖。上述研究均提示, MSCs能够通过旁分泌细胞因子而发挥保护作用。

可以明确的是, 无论是直接接触, 还是间接接

触, MSCs都可以促进组织器官细胞的生长, 对组织细胞发挥保护作用。此外, 肝、肾等器官移植在临床有很大的需求, 目前器官只能来源于捐赠者, 非常稀缺, 且移植后病人需终身服用抗排斥反应的药物。因此, 从病人自身获取细胞使之定向分化生长为组织器官, 无疑具有极大的临床应用价值, 一旦成功, 就会带来一场医学革命。从目前研究来看, 虽然我们离这一目标还有相当大的距离, 但很多实验结果已经说明了这一目标实现的可能性。科研人员面临的主要困难在于对干细胞分化培养的条件没有完全掌握, 而模拟体内真实环境, 将干细胞与分化细胞共培养, 是摸索干细胞分化条件的一个捷径, 相信随着研究的不断深入, 知识的不断积累, 干细胞的定向分化培养一定能在器官移植领域发挥巨大的作用。

3.4 营养神经细胞

刘然等^[39]用Transwell小室构建BMSCs和机械损伤的脊髓背根神经节神经元共培养体系, 结果发现, 单纯损伤神经元细胞培养组仅有26%的神经元存活, 共培养组神经元的存活达到51%, 存活率增加达到近一倍。由于该实验中分离提取的神经元取材于椎体外侧隐窝中的脊神经节, 这个区域除了含有大量的脊髓神经元外还有许多神经前体细胞, 因此他们推测BMSCs不仅对脊髓神经元具有营养、支持、保护的作用, 而且还可能促进了神经前体细胞向神经元分化。Bonner等^[40]也证明了这些前体细胞具有分化潜能, 在BMSCs的作用下, 可分化成脊髓神经元。

虽然MSCs和神经元细胞或神经前体细胞的共培养研究工作开展不多, 但无疑有着很大的理论和应用价值。众所周知, 神经细胞为终末分化细胞, 一旦受损, 神经功能不可逆转恢复。若存在于神经元周围的神经前体细胞能够定向分化为神经细胞, 则由于神经损伤造成的多种疾病皆有望得到治疗, BMSCs对神经前体细胞的促分化作用对神经前体细胞的定向分化研究有着很大的借鉴作用。

3.5 发现造血功能的调节机制

BMSCs是骨髓微环境的重要组成部分, 在造血干细胞生长及增殖方面起重要作用, 体外研究证实BMSCs可通过分泌大量的细胞因子间接调控造血干细胞的生长及增殖, 如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、粒细胞系集落刺激因子(granulocyte colony

stimulating factor, G-CSF)、粒单核系集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF)、fms样酪氨酸激酶3配体 (fms-like tyrosine kinase 3 ligand, FL)、干细胞生长因子 (stem cell factor, SCF)、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 等^[41]。此外, BMSCs除分泌细胞因子外, 还可通过细胞间的直接接触信号来发挥作用。Notch信号是多种动物体内的经典信号通路, 在调节多种组织生长、分化和更新等均发挥着重要作用。哺乳动物表达4种Notch受体 (Notch1-4) 及5种配体 (Jagged 1、Jag 2、Delta 1、Delta 3、Delta 4) 通过细胞间接触活化, 再经过2次蛋白水解, 激活下游靶基因 *Hes1*, 下游靶基因的表达是Notch信号通路活化的标志^[42]。造血系统中, 造血干细胞高度表达Notch分子, 而造血微环境中的骨髓基质细胞含大量的Notch配体^[43-44], 二者的正常表达及相互作用维持着机体正常的造血功能, 当异常表达时可造成恶性增殖性疾病^[45]。

脐带MSCs (UC-MSCs) 与脐血CD34⁺造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 表面存在Notch信号配体及受体的表达, 石蕊等^[46]在体外将二者共培养, 同时在共培养体系中加入Notch信号阻滞剂 DAPT (γ -secretase抑制剂), 发现共培养后HSCs中的 *Hes1* 基因表达明显增加而加入DAPT后 *Hes1* 基因表达未检出明显改变, 说明在UC-MSCs支持造血功能中, 细胞间的直接接触Notch信号可能发挥着重要作用。

以上研究工作从直接调控和间接调控两方面阐明了MSCs对造血干细胞生长及增殖的影响, 对造血功能的调节机制提供了分子水平的支持, 为造血系统疾病的治疗提供了理论基础。

4 干细胞来源不足问题的解决方案

骨髓干细胞来源有限, 取材困难, 往往不能满足需求。为解决这一问题, 研究人员进行了多方面的探索。

有研究者探讨了从其他组织获取干细胞的可能性, 如以来源相对容易的脂肪干细胞等成体干细胞代替骨髓干细胞。Gronthos等^[47]对脂肪抽吸物培养细胞的表面标记研究表明, 这些细胞具有与骨髓

MSCs相似的表面抗原表达, 这说明脂肪来源细胞中的确存在MSCs特性的细胞, 称为脂肪组织来源干细胞。蒋婷等^[48]探讨了脂肪干细胞经共培养诱导为软骨细胞的可行性。他们分离培养日本大耳白兔的脂肪干细胞及肋软骨细胞, 将脂肪干细胞与软骨细胞分层共培养及脂肪干细胞单独培养于6孔板中, 2周后通过safranin-O染色、甲苯胺蓝染色及II型胶原免疫化学染色和RT-PCR检测, 证实了经过诱导后的脂肪干细胞能表达软骨细胞特有的细胞外基质, 说明脂肪干细胞经与软骨细胞共培养后, 可以诱导为软骨表型细胞。

除此之外, 胎盘作为获得MSCs的来源之一, 具有取材方便、来源广泛、供体无痛等优点, 能安全培养储存, 也展现了广阔的临床应用前景^[49-50]。

还有研究者试图将不同个体的干细胞混合培养, 以解决干细胞量不足的问题。周军等^[51]分别通过全骨髓直接培养法及密度梯度法分离培养大鼠骨髓MSCs, 各传至第3代后, 取等量细胞混合后共培养, 发现两种方法获得的同种异体大鼠骨髓MSCs共培养生长良好, 不发生免疫排斥, 证实该类细胞的免疫原性极低。此外, 混合培养的大鼠骨髓MSCs可在体外定向诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞, 神经元和胶质细胞等, 表明其多向分化潜能未受影响。这为干细胞来源不足问题的解决提供了一个有价值的途径。

5 干细胞应用的限制和风险

干细胞在诱导培养的过程中, 有时不能出现人们预期的结果。如Song等^[52]从吸脂得到脂肪间充质干细胞 (human adipose derived adult stem cells, hADSCs), 采用Transwell系统间接共培养法将hADSCs与成熟的脂肪细胞以1:5、1:1、2:1和5:1的比例共培养, 检测hADSCs分化为人类成熟的脂肪细胞的潜能。结果经过8 d或20 d共同培养发现, hADSCs具有高生存能力, 间充质细胞表面标记物CD105的表达下降, 表明脂肪间充质干细胞可以分化到一定程度, 但不能分化为成熟的脂肪细胞。

此外, 有研究发现干细胞在体外培养过程中还会出现癌变倾向。汤郁等^[53]发现, BMSCs在与U266骨髓瘤细胞共培养后, U266诱导BMSCs的HGF和DKK1表达出现异常, 说明原本正常的BMSCs, 可以在骨髓瘤细胞株U266的诱导下, 出现类似骨髓瘤患

者BMSCs的改变^[54-56], 提示骨髓瘤患者BMSCs的异常是获得性。王欢等^[57]对此进行了机理研究。他们应用Transwell培养体系, 将正常骨BMSCs分别与骨髓瘤细胞株U266、RPMI8226细胞共培养, 发现骨髓瘤细胞株U266、RPMI8226能诱导BMSCs EphB4/ephrinB2表达的下调, 可能通过BMSCs成骨-破骨活动的脱耦合, 参与骨髓瘤骨病的发生。

6 展望

药物治疗往往通过干预某些信号通路来发挥作用, 而细胞治疗则是用健康的细胞替代损伤的组织, 更能从根本上治愈疾病。与人胚胎干细胞相比, MSCs不涉及政策因素和道德伦理问题, 且可以从病人自身分离, 没有免疫排斥的问题, 培养比较简单, 容易获得大量细胞。

美国的Osiris Therapeutics公司开发出了两种相对成熟的干细胞产品——Prochymal和Chondrogen, 其中的Prochymal是一种MSCs, 具有控制炎症、促进组织再生并阻止疤痕形成的作用。目前Prochymal能够用于心脏病发作后的心肌组织修复, 保护患1型糖尿病患者体内的胰岛细胞, 以及为患有肺部疾病的病人进行肺部组织修复。这三个领域都已经进入临床II期试验阶段。

总的来说, 与很多成熟的领域相比, MSCs研究还处在初期阶段, “安全性”是科研工作者面前的一个挑战, 其中, 癌变的可能一直是患者无法接受的首要问题, 干细胞治疗本身是否会导致细胞的恶性转化应成为重点关注的问题。鉴于再生医学的诱人前景和MSCs技术的飞速发展, 相信MSCs治疗在不久的将来一定可以实现。

参考文献 (References)

- Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 1978; 272(5653): 501-6.
- 张茜, 金若敏. 细胞共培养技术的研究进展. *中国药理学与毒理学杂志*(Zhang Qian, Jin Ruomin. *Cell co-culture technique and its research progress*. *Chin J Pharmacol Toxicol*) 2011; 25(3): 330-2.
- 何君仁, 杨自权, 李刚, 卫小春. 脱细胞软骨生物支架材料与大鼠骨髓MSCs共培养及体内埋植后的降解. *中国组织工程研究与临床康复*(He Junren, Yang Ziquan, Li Gang, Wei Xiaochun. *Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells on acellular cartilage scaffold biomaterials and in vivo biodegradation of acellular cartilage biomaterials*. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2008; 12(27): 5230-4.
- 杨敏, 苗艳菊, 王绿娅, 杜杰. 巨噬细胞对血管紧张素II作用下三维共培养体系中心脏成纤维细胞转分化的影响. *心肺血管病杂志*(Yang Min, Miao Yanyu, Wang Luya, Du Jie. *Effects of macrophage on cardiac fibroblast transformation in 3-dimensional nano gels co-culture with Ang II treatment*. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*) 2013; 32(4): 493-8.
- 李鸣, 王沂芹, 李燕, 陶光利, 庞琪, 袁发焕. B7家族共刺激分子VSIG4在巨噬细胞/T细胞共培养模型中的作用. *第三军医大学学报*(Li Ming, Wang Yiqin, Li Yan, Tao Guangli, Pang Qi, Yuan Fahuan. *Costimulatory molecule VSIG4 exclusively expressed on macrophages inhibits proliferation and activation in T lymphocytes*. *J Third Mil Med Univ*) 2011; 33(22): 2335-9.
- Doumba PP, Nikolopoulou M, Gomatos IP, Konstadoulakis MM, Koskinas J. Co-culture of primary human tumor hepatocytes from patients with hepatocellular carcinoma with autologous peripheral blood mononuclear cells: Study of their *in vitro* immunological interactions. *BMC Gastroenterol* 2013; 13(1): 17-28.
- 丁涵露, 吴雄飞. PD-L1-PD-1信号通路在肾小管上皮细胞与Jurkat细胞共培养中的作用. *中国现代医学杂志*(Ding Hanlu, Wu Xiongfei. *Effects of PD-L1-PD-1 pathways on the cocultivation of human proximal tubular epithelial cells and Jurkat cells*. *China Journal of Modern Medicine*) 2010; 20(12): 1781-5.
- 杜观环, 李琴, 周永梅, 沈雪敏, 唐国瑶. PD-L2融合蛋白对角质形成细胞/T细胞共培养模型的作用. *临床口腔医学杂志*(Du Guanhuang, Li Qin, Zhou Yongmei, Shen Xuemin, Tang Guoyao. *Effects of PD-L2-Ig in the co-culture model of keratinocytes and T lymphocytes*. *J Clin Stomatol*) 2010; 26(6): 337-40.
- 卢珊, 马向华, 沈捷, 欧红芹, 沈海军. TNF- α 对人脂肪细胞与单核/巨噬细胞共培养体系中脂联素和瘦素表达的影响. *江苏医药*(Lu Shan, Ma Xianghua, Shen Jie, Ou Hongqin, Shen Haijun. *Effects of TNF- α on the expressions of diponectin and leptin in the co-cultured system of human adipocytes and monocytes/macrophages*. *Jiangsu Med J*) 2011; 37(6): 647-9.
- Jiang J, Nicoll SB, Lu HH. Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338(2): 762-70.
- Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldberg RE, *et al*. A Trabecular bone explant Model of osteocyte-osteoblast co-culture for bone mechanobiology. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2(3): 405-15.
- Anderl JL, Redpath S, Ball AJ. A neuronal and astrocyte co-culture assay for high content analysis of neurotoxicity. *J Vis Exp* 2009; doi: 10.3791/1173.
- Jones EV, Cook D, Murai KK. A neuron-astrocyte co-culture system to investigate astrocyte-secreted factors in mouse neuronal development. *Methods Mol Biol* 2012; 814: 341-52.
- 解士海, 陈志强, 马鹏程, 卜今, 周武庆, 崔盘根, 等. 人表皮黑色素细胞与角质形成细胞共培养体外模型中黑素小体转运的观察. *临床皮肤科杂志*(Xie Shihai, Chen Zhiqiang, Ma Pengcheng, Bu Jin, Zhou Wuqing, Cui Pangen, *et al*. *Establishment of the in vitro model of the melanocyte and keratinocyte co-culture system and observation of melanosome transfer*. *J Clin Dermatol*) 2006; 35(5): 286-8.

- 15 张媛, 郭维, 胡吟燕, 郑贵亮, 翟所强. 大鼠耳蜗毛细胞前体细胞与耳蜗间质细胞共培养的实验研究. 听力学及言语疾病杂志(Zhang Yuan, Guo Wei, Hu Yinyan, Zheng Guiliang, Zhai Suoqiang. Co-culture of hair cell progenitors and mesenchymal cells from rat cochlea. Journal of Audiology and Speech Pathology) 2007; 15(3): 205-8.
- 16 刘恺鸣, 迟路湘, 鲁向辉. 缺氧条件下大鼠脑微血管内皮细胞对共培养的人MSCs分化的影响. 第三军医大学学报(Liu Kaiming, Chi Luxiang, Lu Xianghui. Effect of brain microvascular endothelial cells on differentiation of co-cultured mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae) 2008; 30(7): 610-3.
- 17 陆军, 黄薇, 陈欣欣. 非接触共培养法诱导人骨髓MSCs向内皮细胞的分化. 中国组织工程研究与临床康复(Lu Jun, Huang Wei, Chen Xinxin. Inducing human bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into endothelial cells with indirect co-culture. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research) 2008; 12(38): 7435-8.
- 18 杨婧, 项舟, 魏代清, 黄潇, 高宇, 高博, 等. 同一供者及不同供者的人胎盘MSCs与脐静脉内皮细胞复合培养的比较研究. 中国修复重建外科杂志(Yang Jing, Xiang Zhou, Wei Daiqing, Huang Xiao, Gao Yu, Gao Bo, *et al.* Comparative study of composites cultured with human placenta-derived mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells from the same and different individuals. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery) 2013; 27(8): 914-20.
- 19 Zhang B, Yang S, Zhang Y, Sun Z, Xu W, Ye S. Co-culture of mesenchymal stem cells with umbilical vein endothelial cells under hypoxic condition. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci 2012; 32(2): 173-80.
- 20 Jiang YZ, Zhang SF, Qi YY, Wang LL, Ouyang HW. Cell transplantation for articular cartilage defects: Principles of past, present, and future practice. Cell Transplant 2011; 20(5): 593-607.
- 21 Niemeyer P, Koestler W, Sudkamp NP. Problems and complications of surgical techniques for treatment of full-thickness cartilage defects. Z Orthop Unfall 2011; 149(1): 45-51.
- 22 Ishimoto Y, Hattori K, Ohgushi H. Articular cartilage regeneration using scaffold. Clin Calcium 2008; 18(12): 1775-80.
- 23 Kobayashi T, Adachi N, Deie M, Ochi M. Regeneration of articular cartilage. Nihon Rinsho 2008; 66(5): 966-70.
- 24 Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilagenous phenotype *in vitro*. Materials Sci Eng 2004; 24: 391-6.
- 25 LI JW, Guo XL, He CL, Tuo YH, Wang Z, Wen J, *et al.* *In vitro* chondrogenesis of the goat bone marrow mesenchymal stem cells directed by chondrocytes in monolayer and 3-dimensional indirect co-culture system. Chin Med J 2011; 124(19): 3080-6.
- 26 Thompson AD, Betz MW, Yoon DM, Fisher JP. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells induced by coculture with chondrocytes encapsulated in three-dimensional matrices. Tissue Eng Part A 2009; 15: 1181-90.
- 27 冯万文, 莱浙军, 李小民, 常伶文, 徐毓林, 张丽, 等. 骨髓MSCs和软骨细胞共培养种子细胞特征及体内成软骨活性. 中国组织工程研究与临床康复(Feng Wanwen, Lai Zhejun, Li Xiaomin, Chang Lingwen, Xu Yulin, Zhang Li, *et al.* Characteristics of co-culture of autogenic bone marrow mesenchymal stem cells with chondrocytes as seed cells and *in vivo* chondrogenic activity. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research) 2008; 12(3): 442-6.
- 28 张蕾, 陈槐卿, Nguyen Tran. 与韧带成纤维细胞间接共培养对大鼠骨髓MSCs胶原蛋白和粘多糖-C表达的影响. 生物医学工程学杂志(Zhang Lei, Chen Huaqing, Nguyen Tran. Expressions of type I and type III collagens and tenascin-C in rat bone mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts. J Biomed Eng) 2007; 24(4): 846-51.
- 29 Lee IC, Wang JH, Lee YT, Young TH. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. Biochem Biophys Res Commun 2007; 352(1): 147-52.
- 30 Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: Involvement of the extracellular matrix. Spine (Phila Pa 1976) 2004; 29(23): 2691-9.
- 31 张福勇, 吴小涛, 王运涛, 鲍军平, 朱磊, 邱匀峰. 兔纤维环细胞和骨髓MSCs共培养的初步研究. 东南大学学报(医学版)(Zhang Fuyong, Wu Xiaotao, Wang Yuntao, Bao Junping, Zhu Lei, Qiu Yunfeng. Primary study on the coculture of rabbit bonemarrow mesenchymal stem cells and annulus fibrosus cells. J Southeast Univ Med Sci Edi) 2008; 27(3): 195-8.
- 32 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418(6893): 41-9.
- 33 蒋泽生, 高毅, 慕宁. 人骨髓来源多能成体祖细胞与人肝细胞体外直接共培养向肝样细胞分化的实验研究. 广东医学(Jiang Zesheng, Gao Yi, Mu Ning. Guangdong Medical Journal) 2007; 28(2): 202-4.
- 34 王骏, 黄锋先, 余学清. 骨髓MSCs共培养减轻顺铂所致的肾小管上皮细胞损伤. 中国病理生理杂志(Wang Jun, Huang Fengxian, Yu Xueqing. Protective effects of bonemarrow mesenchymal stem cells against the renal tubular epithelial cell damage induced by cisplatin. Chinese Journal of Pathophysiology) 2008; 24(7): 1378-83.
- 35 Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am J Physiol 2005; 289(1): F31-F42.
- 36 温静, 程庆砾, 马强, 齐云, 赵佳慧, 杜婧, 等. 肾组织干细胞对人肾小管上皮细胞损伤修复的作用. 北京大学学报(医学版)(Wen Jing, Cheng Qingli, Ma Qiang, Qi Yun, Zhao Jiahui, Du Jing, *et al.* Protective effects of kidney stem cells on injured human renal tubular epithelial cells. Journal of Peking University Health Sciences) 2013; 45(4): 619-24.
- 37 Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, *et al.* Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. Nat Biotechnol 2003; 21(7): 763-70.
- 38 Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, Zanetta L, Sampaolesi M, Bai A, *et al.* Mesoangioblasts, vessel associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: A comparison with bonemarrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25(4): 692-97.
- 39 刘然, 范东艳, 金鹏, 范洪学, 王苹. 细胞共培养体系在观察骨髓MSCs对损伤脊髓神经元生长存活影响中的应用. 中国

- 康复医学杂志(Liu Ran, Fan Dongyan, Jin Peng, Fan Hongxue, Wang Ping. Effect of bone mesenchymal stem cells on survival of spinal cord neurons after injury using co-culture system. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine) 2011; 26(2): 116-9.
- 40 Bonner JF, Blesch A, Neuhuber B, Fischer I. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord. *J Neurosci Res* 2010; 88(6): 1182-92.
- 41 Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011; 112(4): 1206-18.
- 42 Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2437-47.
- 43 Jiao Z, Wang W, Xu H, Wang S, Guo M, Chen Y, *et al.* Engagement of activated Notch signalling in collagen II-specific T helper type 1(Th1)-and Th17-type expansion involving Notch3 and Delta-like1. *Clin Exp Immunol* 2011; 164(1): 66-71.
- 44 Gómez-del Arco P, Kashiwagi M, Jackson AF, Naito T, Zhang J, Liu F, *et al.* Alternative promoter usage at the Notch1 locus supports ligand-independent signaling in T cell development and leukemogenesis. *Immunity* 2010; 33(5): 685-98.
- 45 Mirandola L, Comi P, Cobos E, Kast WM, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R. Notch-ing from T-cell to B-cell lymphoid malignancies. *Cancer Lett* 2011; 308(1): 1-13.
- 46 石蕊, 徐曼, 苏永峰, 张斌, 陈虎. Notch 信号介导共培养脐带MSCs和造血干细胞的相互作用. 细胞与分子免疫学杂志(Shi Rui, Xu Man, Su Yongfeng, Zhang Bin, Chen Hu. Notch pathway gene expression after co-culture of umbilical cord mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *Chin J Cell Mol Immunol*) 2012; 28(8): 793-6.
- 47 Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189(1): 54-63.
- 48 蒋婷, 杨泽龙, 刘康, 陈竹, 白亦光, 李凌云, 等. 体外共培养诱导脂肪干细胞向软骨表型细胞分化及鉴定的实验研究. 川北医学院学报(Jiang Tiny, Yang Zelong, Liu Kang, Chen Zhu, Bai Yiguang, Li Lingyun, *et al.* The study on inducing adipose-derived stem cells into chondrogenic phenotype cells by co-culture and identification *in vitro*. *Journal of North Sichuan Medical College*) 2013; 28(2): 99-102.
- 49 Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22(5): 649-58.
- 50 Longo UG, Loppini M, Berton A, La Verde L, Khan WS, Denaro V. Stem cells from umbilical cord and placenta for musculoskeletal tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012; 7(4): 272-81.
- 51 周军, 杨惠林, 岑建农, 李振江, 陈文明, 陈子兴. 同种异体大鼠骨髓MSCs共培养及多向分化潜能鉴定. 苏州大学学报(医学版)(Zhou Jun, Yang Huilin, Cen Jiannong, Li Zhenjiang, Chen Wenming, Chen Zixing. Co-culture and multilineage differentiation potential characterization of allogenic rat bone mesenchymal stem cells. *Suzhou University Journal of Medical Science*) 2007; 27(2): 196-201.
- 52 Song KD, Li WF, Wang H, Wang H, Liu TQ, Ning RM, *et al.* Investigation of co-culture of human adipose-derived stem cells and mature adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 167: 2381-7.
- 53 汤郁, 陆化, 张广莲, 陆益龙, 胡慧瑾, 李俊霞, 等. 与骨髓瘤细胞共培养时对骨髓间充质细胞表达DKK1和HGF的影响. 南京医科大学学报(自然科学版)(Tang Yu, Lu Hua, ZhangG Guanglian, Lu Yilong, Hu Huijing, Li Junxia, *et al.* The “cross-talk” between bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) and U266 cell line dysregulated the expression of DKK1 and HGF in MSCs. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing: Natural Science*) 2011; 31(5): 612-6.
- 54 Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 2007; 21(5): 1079-88.
- 55 Garayoa M, Garcia JL, Santamaria C, Garcia-Gomez A, Blanco JF, Pandiella A, *et al.* Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia* 2009; 23(8): 1515-27.
- 56 Todoerti K, Lisignoli G, Storti P, Agnelli L, Novara F, Manfredini C, *et al.* Distinct transcriptional profiles characterize bone microenvironment mesenchymal cells rather than osteoblasts in relationship with multiple myeloma bone disease. *Exp Hematol* 2010; 38(2): 141-53.
- 57 王欢, 李皎, 朱彦, 陆化, 童珊珊, 余先球, 等. 骨髓MSCs与骨髓瘤细胞共培养时 EphB4/ephrinB2 表达异常. 南京医科大学学报(自然科学版)(Wang Huan, Li Jiao, Zhu Yan, Lu Hua, Tong Shanshan, Yu Xianqiu, *et al.* The EphB4/ephrinB2 axis is dysregulated in bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) after communication with myeloma cell lines. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing: Natural Science*) 2012; 32(2): 177-82.