

组织工程中应力对骨髓间充质干细胞 分化为成骨细胞的影响

李娜 张西正* 郭勇

(军事医学科学院卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要 骨髓间充质干细胞具有自我复制、未分化的特点, 并可在不同条件下分化为中胚层起源的多种细胞, 是一种成体多能干细胞。就组织工程而言, 良好的种子细胞是组织工程技术的关键, 骨髓间充质干细胞的性质决定了其在骨组织工程领域中的重要地位。此外, 骨骼系统属于机体的运动系统, 承担体重是骨骼的重要功能之一; 而且, 人体内几乎所有的细胞都会受到力学因素的影响, 故有必要研究力学因素对骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的作用, 为骨髓间充质干细胞的体外扩增、诱导分化及培养提供一种新途径。

关键词 组织工程; 骨髓间充质干细胞; 应力; 成骨细胞

近几年骨组织工程在种子细胞、生物活性因子、支架材料等方面取得了巨大的进展, 并培养出骨样组织。其中, 用骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)作为种子细胞的研究是该领域的热点之一。目前研究的主要进展在以下几个方面: BMSCs的分离纯化方法; 寻找最佳诱导分化因子; 寻找最适宜的细胞培养密度; BMSCs在基因治疗中的应用。但是, 纵观体外培养构建有生命组织用以植入体内替代病损组织的研究中, 应力对细胞功能的影响被严重忽略了。现已知应力是细胞功能的重要调节因素之一, 并能在组织形成中影响其结构与功能, 故有必要研究力学因素对BMSCs的影响。以下综述了BMSCs作为组织工程的种子细胞的研究进展以及应力对其增殖、分化为成骨细胞的影响。

1 骨髓间充质干细胞的生物学特性

BMSCs是骨髓中一群含量稀少的前体细胞, 有自我复制、未分化的特点, 并可在不同条件下分化为中胚层起源的多种细胞, 如: 骨、软骨、脂肪、韧带和骨髓基质^[1]。近年来更多证据表明, BMSCs具有难以预料的分化潜能, 可以分化为神经组织等^[2]。BMSCs的分化依赖于生物体遗传性规定的严格的程序和模式, 处在基因的调控下, 同时也

受环境因素的影响。

1974年Friedenstein等^[3]将全骨髓在塑料培养皿中培养, 4 h后倾倒非贴壁生长的细胞, 贴壁生长的细胞继续培养, 培养数代后部分细胞分化为骨及软骨细胞。目前普遍采用的培养方法是对Friedenstein等建立的方法的改进, 采用密度梯度离心等辅助手段, 提高BMSCs原代分离的效率。Jiang等^[4]建立的方法是筛除骨髓细胞中的CD45⁺(白细胞)和糖蛋白A⁺(红细胞), 应用低血清(2%)或无血清培养, 体系中加入多种生长因子, 获得的细胞有更强的分化能力。

BMSCs可依靠细胞的表面标志来鉴定, 流式细胞仪利用荧光素的化学特性和受体的独特结构相结合对BMSCs进行鉴定和分选, BMSCs细胞表面标志物CD105、CD166和CD44阳性, 同时CD14、CD34和CD45阴性。有些实验室以BMSCs作为免疫原制备出单克隆抗体, 用以确定一种或更多标志来识别BMSCs并对其进行分类^[5], 然而, 到目前为止分离纯的BMSCs仍没有实现, 其中, 最接近要求

收稿日期: 2004-02-12 接受日期: 2004-06-08

国家自然科学基金资助项目(No. 10172093); 重庆大学生物力学与组织工程教育部重点实验室访问学者基金资助

*通讯作者。Tel: 022-84656717, Fax: 022-84656717, E-mail: z56787@sohu.com

的是单克隆抗体 Stro-1^[6]。此外, 还可通过鉴别干细胞中特异性的基因和转录因子, 用 PCR 技术检测活化的和导致细胞具有特异性的基因的表达, 通过识别“基因标志”来鉴别干细胞。

2 骨髓间充质干细胞在骨组织工程中的应用

良好的种子细胞是骨组织工程技术的关键。BMSCs 具有成骨潜能^[7], 并且来源广泛, 取材简便, 体外培养要求条件不高, 细胞增殖快, 生长稳定, 经多次传代成骨能力不减弱。同时, 由于 BMSCs 属于未分化的干细胞, 其细胞表型尚不成熟, 自体或同种异体移植后排斥反应轻。因此, BMSCs 作为理想的骨组织工程种子细胞受到重视。

2.1 成骨、软骨潜能

将大鼠、小鼠、豚鼠、兔和狗的含有间充质干细胞的骨髓转移到扩散小室(diffusion chambers), 再将其种植于裸鼠或同源物种体内, 实验证明可以形成骨组织^[8]。此外, 将人 BMSCs 接种在含有转化生长因子(TGF)的三维藻酸盐层状结构支架上培养, 细胞形态发生了特征性改变, 同时检测到软骨细胞外基质(ECM)沉着; 体外诱导 BMSCs 分化为软骨细胞, 再将细胞接种于碳纤维网上植入受损的关节部位, 结果比单纯碳纤维网植入显示出明显的促进关节软骨修复作用^[9]。

2.2 向成骨细胞分化演变过程

干细胞并不直接分化为终末成骨细胞, 而是先分化为短暂扩增细胞, 短暂扩增细胞经过数次分裂后具有分化为成骨谱系祖细胞的潜能, 继而再进一步分化为终末成骨细胞。BMSCs 向成骨成熟细胞的分化过程, 根据目前的研究情况来看也是一个多步骤的过程^[10]。BMSCs 分化为骨细胞的进程大致分为 3 个阶段: 迟滞期, 快速生长期, 稳定期; 各个时期细胞形态和生长情况各有其特点^[11]。根据不同阶段细胞表达的表面抗原可将 BMSCs 分化为成骨细胞的过程描述为: BMSCs- 骨祖细胞- 前成骨细胞- 过渡型成骨细胞- 分泌型成骨细胞- 骨细胞性成骨细胞- 骨细胞^[12]。碱性磷酸酶是成骨细胞分化的早期标志物, 是在碱性条件下水解多种磷酸酯并具有转磷酸基作用的一组酶, 骨型碱性磷酸酶在人体的生理功能是在成骨过程中水解磷酸酯, 为钙的沉积提供必需的磷酸, 同时水解焦磷酸盐, 解除它对骨盐

形成的抑制作用, 启动钙化。检测碱性磷酸酶活性是衡量 BMSCs 向成骨细胞方向分化的程度和成骨细胞功能状态的一个重要指标。骨钙素是成骨细胞分化成熟的标志。基质中的主要成分 I 型胶原是钙盐沉着和细胞附着的支架。故一般将 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素、矿化基质作为成骨细胞鉴定和功能状态评价的指标。

2.3 相关的生物活性因子

诱导 BMSCs 分化为成骨细胞的生物活性因子有骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、地塞米松(dexamethasone, Dex)等。BMP 能诱导机体内的间充质细胞不可逆地分化为软骨和骨细胞。将 BMP 植入软组织内, 可异位诱导新骨的形成。通过裸鼠皮下移植物的成骨情况评价 4 种组合: 羟基磷灰石(HA), BMP/HA, BMSCs/HA, BMSCs/BMP/HA, 其中, BMSCs/HA 组在 4 周时有中等量骨形成, 8 周时有大量骨形成。BMSCs/BMP/HA 组 2 周时有明显的骨形成, 4 周、8 周可见更多的骨结构, 并且无论在蛋白质水平还是在基因水平碱性磷酸酶和骨钙蛋白均有高表达^[13]。TGF- β 的生物学作用有促进细胞增殖、调节细胞分化、促进细胞外基质合成、调节免疫。它对 BMSCs 作用取决于许多因素, 包括细胞分化状态、生长条件以及其他生长因子的存在。将 TGF- β 注入骨膜下, 可引起骨膜内间充质干细胞大量增殖, 产生软骨细胞、成骨细胞, 并以软骨内成骨的方式形成骨组织^[14]。Dex 属于糖皮质激素, 对于 BMSCs/ 支架复合物的成骨过程而言, Dex 是必需的培养基包含物质, 其作用较复杂^[15,16]。

另外, 将 BMSCs 的成骨潜能与其基因治疗相结合。利用基因工程技术将各种生长因子的基因转入细胞, 导入的目的基因使生物活性因子得以表达, 继而通过自分泌或旁分泌途径持续促进细胞的增殖和分化, 最终形成骨组织。如 Lieberman 等^[17]通过腺病毒将 BMP-2 基因转入鼠的 BMSCs, 一周后即有效表达, 再与脱钙骨基质复合后植入同基因模型裸鼠体内, 最终形成丰富的异位骨, 并有血管长入。

3 应力对骨髓间充质干细胞的影响

人体内几乎所有的细胞都会受到力学因素的影响

响,如剪应力,拉、压应力,剪应变,拉、压应变,静载荷、动载荷等。力学刺激会影响细胞的代谢、基因表达、形态、表型、生长因子分泌等,导致细胞的生物学行为发生改变。因此,力学因素是诱导细胞产生生物学反应、影响人体生理变化的重要原因之一。生物力学因素在骨形成过程中有非常重要的作用。

3.1 生物反应器的应用

构造组织工程化骨不仅需要足够数量的种子细胞和理想的支架材料,而且体外培养环境对骨形成的质量起关键的作用。由美国航空航天局(NASA)研制的精确组织培养系统——旋转壁式生物反应器(RCCS)具有许多优势,它更接近于三维悬浮生长。由于反应器中的培养液随容器一同旋转,相互之间无相对运动,因此其损害性搅动和剪应力趋于零。用旋转壁式生物反应器培养出了直径几厘米的细胞团样组织块,其分化、三维增殖和细胞功能都远优于其他生物反应器培养的细胞^[18]。

为了更好地模拟生物内部环境,对生物反应器中培养的人工组织施加力学因素模拟人体组织环境是组织工程的一个发展方向。研究力学因素对细胞和组织作用的生物反应器早在1939年Glucksmann将鸡胚胎骨内膜细胞培养在肋间肌基质上,肌肉萎缩肋骨彼此靠近对培养的细胞施加了应力^[19]。另外,用计算机控制可以施加复杂应变的生物反应器,能够在BMSCs与工程化组织之间建立一种连接关系,并提供各种力学和生化条件^[20]。生物反应器是组织工程的一个重要环节,组织在特制的生物反应器内生长,对包括拉伸、剪切、压缩等力学载荷做出反应,从而使工程化组织更接近源组织并具有良好的力学性能。

3.2 应力作用下骨髓间充质干细胞的变化

采用可以对细胞产生周期性张力和拉力的特制培养皿培养BMSCs,与不受力培养的细胞相比,应力作用下培养细胞的碱性磷酸酶活性、骨钙蛋白水平、DNA含量、细胞干重均明显升高^[21]。把BMSCs复合到羟基磷灰石(HA)支架材料上,并放入加压培养系统长期低压力培养,当BMSCs/HA复合物在100 mmHg的压力作用下培养两周后,再植入同源Fischer鼠皮下,13周后电镜可以看到多孔HA表面被成骨细胞和细胞外胶原基质所覆盖,骨组织形成加快。这一结果说明经过长期低压力作用后的

BMSCs有更强的成骨潜能^[22]。周期性流体静压力对人BMSCs分化为软骨细胞有一定的影响,将从骨髓分离的间充质干细胞培养在成软骨条件培养基中并施加周期性流体静压力,分别于14天和28天收集细胞做组织学、免疫组织化学、DNA含量测定、细胞外基质分析,提示流体静压力显著提高了已分化的BMSCs合成蛋白多糖和胶原的能力,应力刺激在软骨修复和重建过程中起着重要作用^[23]。用胶原海绵作为支架材料,对BMSCs进行三维灌注培养,发现细胞活性与功能加强,说明剪切应力对BMSCs有一定的影响。将大鼠骨髓基质细胞悬液接种于钛筛网支架,分别在静态环境或灌流系统中培养4、8和16天,结果显示第8天灌流组与静态组相比DNA含量明显增高,扫描电镜观察到灌流组16天时细胞层及钙化基质完全覆盖支架,且基质扩展进入支架深部,静态组筛网仅有薄层基质覆盖且位于筛网上表面,亦说明剪切应力较早促进细胞的增殖分化及胞外基质钙化^[24]。

长骨骨折愈合过程中,应力刺激激活了BMSCs,继而诱导其分化,数月后形态完整、力学性能良好的骨组织形成。人或牛BMSCs在应力刺激作用下形态变为长梭形,并沿应力方向排列,对照组细胞分布杂乱^[25]。作用于BMSCs的应力大小不同,则BMSCs的响应情况不同,组织应变在0%~3.75%时BMSCs分化为骨,应变在3.75%~11.25%时分化为纤维软骨,应变在11.25%以上时分化为纤维连接组织。将新西兰白兔的BMSCs接种至聚丙烯酯-乙交酯(PLGA)支架上,植入有10 mm肌腱缺损的动物模型体内,术后任动物自由活动,12周检测组织的拉伸强度和弹性模量,结果为正常组织的87%和62.6%,说明应力作用条件下新生成组织的力学性能与正常组织接近^[26]。

3.3 力学因素影响BMSCs变化的机制

周期性基底应变能够影响人BMSCs增殖和向成骨细胞的分化。对在成骨条件培养基中培养的人BMSCs加载相等的二维周期基底应变,观察到细胞增殖受到抑制,同时基质钙化比对照组增加了2.3倍。得出结论,应力作用可能激活了细胞外信号调节激酶(ERK1/2)和p38活化有丝分裂原蛋白激酶通路,但对c-Jun的N端激酶磷酸化作用没有影响。应力诱导的基质钙化很大程度上由ERK1/2信号通路介导,当抑制ERK1/2则削弱了55%的钙盐沉积。

抑制 p38 通路导致了更成熟的成骨表型, 说明在应力诱导成骨分化过程中 p38 信号起到了负调节作用^[27]。进一步论证了应力能够调节 BMSCs 的功能, 力学刺激对组成间充质组织的这种特殊细胞发挥了重要的作用。

细胞所受应力对细胞的增殖与分化有重要的影响。应力改变了细胞骨架形状, 从而使细胞在各种不同的遗传程序之间转换, 铺展开的细胞更有可能分裂, 而无法铺展开的细胞激活凋亡程序。提示我们 BMSCs 可能是一种力学可兴奋细胞, 生理水平的应力作用可以促进 BMSCs 的增殖与分化。

Altman 等^[25]认为复杂的应力作用显然参与了体内细胞和组织的发展, 并影响了组织的结构和功能。为了解应力刺激与组织表型之间的关系, 他们进行了新式生物反应器的设计 and 应用研究, 这种新式生物反应器可以施加复杂的三维应力, 并研究了这种应力对 BMSCs 分化为特殊组织——骨和韧带所产生的影响。此项研究论证了环境因素在诱导前体祖细胞向目标组织表型分化时所起的重要作用。骨可以感知力学刺激, 并且通过改变质量、几何形状、密度以适应力学刺激。实验是使接种到三维部分脱钙骨支架上的 BMSCs 受到四点弯曲生物反应器的应力作用, 研究了应力和 Dex 对 BMSCs 成骨分化、基质矿化的影响。BMSCs 在受到应变作用后可以分化为成熟的成骨细胞, 进而形成骨组织结构。由此得出以下结论: 骨组织微环境的特征——三联管腔结构和细胞外基质复合物在骨细胞应力传导过程中发挥非常重要的作用, 应力通过提高碱性磷酸酶活性以及碱性磷酸酶、BMP 转录水平来促进 BMSCs 的成骨分化。机制可能是通过细胞结合点 (cell binding sites) 转换应力以促进细胞分化。力学信号作用于细胞表面受体, 导致包括触发细胞外基质成分合成分泌的基因表达在内的多级反应。应力还可以通过影响营养、氧气传递、新陈代谢速率等来促进细胞分化。

4 小结

骨缺损修复一直是医学研究的重点之一。临床上对创伤、感染和肿瘤切除所造成的大范围骨缺损

的修复未找到理想的解决方法。应用最多的自体骨、异体骨和人工骨都有各自的缺点。组织工程化骨有望能成为理想的替代材料。BMSCs 的生物学特性吸引了许多学者探讨其体外培养的最佳组合条件, 包括多种因子的协同作用和环境因素的影响, 使 BMSCs 快速、大量向成骨细胞转化、扩增。目前对 BMSCs 诱导分化为成骨种子细胞的研究主要采用化学物质、生长因子等, 诱导的细胞不够特异和单一, 而且不能稳定在成骨细胞阶段, 会继续向终末分化。因此, 要获得特异单一而稳定的成骨种子细胞, 有必要研究力学因素对 BMSCs 诱导分化的影响, 了解应力、应变诱导 BMSCs 分化成单一稳定的成骨种子细胞的条件, 模拟体内 BMSCs 分化的条件, 为种子细胞的体外扩增、诱导分化以及培养提供一种新途径, 对于骨组织工程有着非常重要的意义。

参考文献 (References)

- [1] Pittenger MF *et al. Science*, 1999, **284**: 143
- [2] Deng W *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**: 148
- [3] Friedenstein AJ *et al. Exp Hematol*, 1974, **2**: 83
- [4] Jiang Y *et al. Nature*, 2002, **418**: 41
- [5] Haynesworth SE *et al. Bone*, 1992, **13**: 69
- [6] Gronthos S *et al. Blood*, 1994, **84**: 4164
- [7] Haynesworth SE *et al. Bone*, 1992, **13**: 81
- [8] Tabuchi C *et al. J Clin Invest*, 1986, **78**: 637
- [9] Kavalkovich KW *et al. In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, **38**: 457
- [10] 潘兴华等. *中国修复重建外科杂志*, 2002, **16**: 329
- [11] Colter DC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3213
- [12] Caplan AI. *J Orthop Res*, 1991, **9**: 641
- [13] Noshi T *et al. Artif Organs*, 2001, **25**: 201
- [14] 孙玉鹏. *中华骨科杂志*, 1995, **15**: 610
- [15] 魏宽海等. *中国修复重建外科杂志*, 2001, **15**: 232
- [16] Cheng SL *et al. Endocrinology*, 1994, **134**: 277
- [17] Lieberman JR *et al. J Orthop Res*, 1998, **16**: 330
- [18] Goodwin TJ *et al. J Cell Biochem*, 1993, **51**: 301
- [19] McMahon JM *et al. Anat Rec*, 1995, **242**: 147
- [20] Altman GH *et al. J Biomech Eng*, 2002, **124**: 742
- [21] Yoshikawa T *et al. J Biomed Mater Res*, 1998, **41**: 568
- [22] Dong J *et al. Biomed Mater Eng*, 2002, **12**: 203
- [23] Angele P *et al. J Orthop Res*, 2003, **21**: 451
- [24] van den Dolder J *et al. J Biomed Mater Res*, 2003, **64A**: 235
- [25] Altman GH *et al. FASEB J*, 2002, **16**: 270
- [26] Ouyang HW *et al. Tissue Eng*, 2003, **9**: 431
- [27] Simmons CA *et al. J Biomech*, 2003, **36**: 1087

Osteogenic Induction of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells within Strain for Tissue Engineering

Na Li, Xi-Zheng Zhang*, Yong Guog

(Institute of Military Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

Abstract Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) are a population of cells capable of replicating as undifferentiated cells and that have the potential to differentiate to lineages of mesoblastic origin. As such, they represent an important paradigm of multipotent adult stem cells. Cells are a key to tissue engineering, and the character of BMSCs have impacted significantly on the progress of the tissue regeneration and repair. Furthermore, skeleton system is the locomotion part of the organism, and it's primary function is supporting; moreover, complex mechanical forces are clearly involved in cell development *in vivo*. Therefore, it is necessary to investigate the effect of strain on proliferation and differentiation of BMSCs, and may provide increased insight in the role of strain on osteogenic differentiation of BMSCs *in vitro* and lead to improved strategies in bone tissue engineering.

Key words tissue engineering; bone marrow-derived mesenchymal stem cells; strain; osteoblast

Received: February 12, 2004 Accepted: June 8, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 10172093) and the Visiting Scholar Foundation of the Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education at Chongqing University

*Corresponding author. Tel: 86-22-84656717, Fax: 86-22-84656717, E-mail: z56787@sohu.com