

微环境对间充质干细胞向平滑肌细胞定向分化的影响

刘晓芳 王延洲 徐惠成 梁志清*

(第三军医大学第一附属医院妇产科, 重庆 400038)

摘要 间充质干细胞(MSCs)的多向分化潜能这一特性使 MSCs 移植在平滑肌组织损伤疾病的治疗中有良好的应用前景,但是干细胞移植治疗本身并没有获得预期的疗效,原因在于,干细胞体内诱导分化的研究还有很多关键性的问题没有解决。其中最值得关注的是:干细胞移植后,在体内微环境诱导下干细胞的适应性变化及其机制。目前的研究已经发现许多能诱导 MSCs 向平滑肌分化的因素,如生长因子、细胞与细胞间接触、细胞外基质的作用等。本文就微环境的几个因素,包括:细胞与细胞间的接触,细胞周围基质中的机械力,基质的弹性等对干细胞向平滑肌细胞定向分化的影响进行综述。

关键词 间充质干细胞;微环境;平滑肌细胞

随着对干细胞研究的不断深入、不断了解,人们对干细胞也越来越关注。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为成体干细胞的一种,具有自我更新和多向分化潜能、取材方便、扩增迅速、可自体移植等特点,因此,利用 MSCs 的多向分化的特性及通过基因修饰能在体外表达多种外源目的基因的特性,将其作为种子细胞用于细胞治疗和基因治疗的研究已成为当前研究的热点。本文就当前研究中涉及到的微环境对 MSCs 分化及向平滑肌细胞定向分化的影响因素作一综述。

1 MSCs及干细胞巢的相关概念

MSCs 是一群来源于中胚层的具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞。最新的关于 MSCs 的界定范围由国际细胞治疗协会间充质和组织干细胞委员会^[1]提出,确定了 MSCs 的 3 个最低标准,即可贴附于塑料培养瓶、特定表面抗原的表达和多向分化潜能。具体来说就是,首先 MSCs 在标准的培养条件下是可以贴附于塑料培养瓶的,其次在表型上, MSCs 必须表达一系列非特异性的标记,比如说 CD105、CD73 和 CD90,不表达造血细胞的标记如 CD45、CD34、CD14、CD11b、CD7、CD19 和 HLA-DR,并且这些细胞具有在体外分化为骨、软骨和脂肪细胞系的能力。基于 MSCs 的这些特性,将 MSCs 定向诱导为特定的组织细胞的方法和技术已经很成熟了,但是如何在体外保持干细胞的潜能的同时

提高组织特异性干细胞的数量仍然是个难点^[2],普遍接受的观点认为干细胞处在一个专门的巢中,如已经发现的小肠绒毛的隐窝、表皮毛囊等,不同的干细胞巢中的微环境都具有相同的协调干细胞的再生与分化的功能,因此,在体外模仿组织中的微环境成为研究干细胞的再生与分化机制的一个突破点^[3]。那么微环境又是如何影响 MSCs 分化的呢?

2 微环境对 MSCs 分化的影响

从对干细胞巢的研究中可以看出,不同的干细胞巢都具有共同的特征,即为干细胞的分化提供重要的细胞与细胞间接触与旁分泌信号分子^[2],通过细胞外基质中的成分单独或是协同触发细胞内的信号转导。体内实验表明移植的 MSCs 能在组织微环境中分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞^[4]。由此可以看出,微环境对 MSCs 分化的影响主要有 3 个方面:(1)细胞与细胞间接触的影响;(2)细胞与细胞外基质间相互作用的影响;(3)可溶性信号分子的影响。于是,科研人员通过在体外模仿干细胞微环境的一方面或几个方面协同来研究 MSCs 分化的可能机制。研究认为,当微环境发生改变时,细胞外或细胞间的某些信息可通过整合素或是配体依赖的方式传递给干细胞,以触发跨膜信号转导,调控细胞的基因表达。

收稿日期: 2008-12-19 接受日期: 2009-07-22

国家自然科学基金资助项目(No.30772309, No.30801234)

* 通讯作者。Tel: 023-68754409, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

这一过程不仅可以改变干细胞的分裂方式,而且也激活干细胞的多潜能性,使干细胞产生一种或多种定向祖细胞,以适应组织修复的需要。现以MSCs向平滑肌分化的研究进展具体阐述细胞与细胞间接触、细胞与细胞外基质间相互作用对MSCs分化的影响。

3 微环境对MSCs向平滑肌细胞分化的影响

3.1 细胞与细胞间接触对MSCs向平滑肌分化的影响

在MSCs与其支持细胞间直接的细胞间接触对于干细胞的维持及分化起着关键的作用,并且与何种细胞接触在很大程度上影响着它的分化方向。Ball等^[5]对细胞间直接接触是否影响MSCs的分化进行了研究,他们将表达部分平滑肌细胞特征的MSCs与血管内皮细胞进行间接接触和直接接触共培养,当MSCs与血管内皮细胞非接触共培养时,MSCs排列整齐,但在细胞发生直接接触后,虽然MSCs内 α -肌动蛋白mRNA及蛋白质水平明显增加,却导致了平滑肌肌动蛋白的断裂。该研究清楚说明了细胞间的直接接触对细胞的分化产生影响,一方面使细胞内蛋白质的表达水平增加,另一方面还使细胞内的蛋白质形态发生了改变。Fukuhara等^[6]体外分别培养表达绿色荧光蛋白的MSCs、心肌细胞及两者混合培养7天发现,仅混合培养具有心肌细胞表型、肌管样结构形成并与心肌同步收缩,且表达肌球蛋白重链、肌钙蛋白-I、心钠素及连接蛋白43,表明细胞接触是影响干细胞定向分化的重要因素,Yoon等^[7]在此基础上进一步做了新生鼠的心肌细胞和成年鼠的心肌细胞与MSCs的共培养,发现只有与新生鼠的心肌细胞接触共培养才能诱导MSCs向心肌细胞分化,该研究在一定程度上表明,细胞间的直接接触在启动定向分化因子转录,调节生长因子表达,诱导干细胞向不同组织分化影响上还依赖于细胞的发育阶段。虽然有些研究认为共培养细胞的表型改变是由细胞融合造成的,即干细胞形态的改变并不是由细胞表型直接转变而成,是相互接触的两种细胞发生了融合,不过更多的研究报道,高水平的转分化能力并不包含细胞融合的可能,Yoon等^[7]的研究将MSCs与多聚甲醛固定了的新生心肌细胞共培养,发现细胞也可以发生转分化。

现阶段对直接的细胞间接触的研究集中在细胞因子的状态上,体内的细胞因子存在两种状态,一种

是可溶性的,另一种是以固相存在,粘附于细胞或是细胞外基质表面,Alberti等^[8]和Phillippi等^[9]的实验中都说明了固定于细胞培养皿表面的细胞因子相对于溶于培养液中的因子有着更明显的作用,这可能是细胞间接触起作用的一个重要方面。上述事实都表明除了可溶性细胞信号分子外,直接的细胞-细胞间相互作用对于干细胞的分化是非常必要的。

3.2 细胞外基质对MSCs向平滑肌分化的影响

细胞外基质作为机体组织的重要结构成分,它提供了细胞生成的直接微环境,对细胞的基本生命活动具有重要的影响,细胞外基质与细胞的相互作用,直接或间接地体现为细胞外基质在细胞生命活动中的各种极其重要的生物学功能。关于MSCs的分化,目前的研究主要集中在细胞外的机械力、基质的弹性对MSCs分化的影响。

3.2.1 机械力对MSCs向平滑肌分化的影响

力学刺激是调节骨髓MSCs分化的一种重要途径。机械力学存在一切的细胞微环境中,在各种组织、细胞中起重要的调控作用。身体微环境的状况是干细胞和组织发育的分子信号的潜在调节者,整联蛋白的作用力以及细胞外基质机械力的变化,都可以改变细胞骨架的结构,因此同时激活多个信号通路,在体外决定着细胞的命运^[10]。同时,机械力还可以调节平滑肌细胞的增殖和成熟,例如,切应力可以上调TGF β 1的活性,进而抑制平滑肌细胞的增殖,周期性的张力可以促进平滑肌细胞从合成型向收缩型的转变。据报道,机械力可以使不成熟的平滑肌细胞和非平滑肌细胞表达平滑肌特异性的细胞骨架蛋白,针对这个理论,Kobayashi等^[11]进行了机械力促进MSCs表达平滑肌细胞特性的研究,他设计了不同机械力,通过Western印迹和免疫荧光技术对处在不同压力下的MSCs进行了平滑肌肌动蛋白和平滑肌肌球蛋白重链的检测,都有阳性表达。

机械力刺激体外细胞所引起的一系列变化,是通过一定的途径,将细胞外力学信号转导至细胞内,从而启动或调节相关的基因和蛋白质的表达与分布。国内外大量的研究表明,机械载荷刺激细胞组织后,其基本的机械力学生物学转导机制与调节过程具有相同信号途径,主要为:通过细胞外基质信号-跨膜整合素-细胞骨架构象改变对信号的传递,激活细胞膜力敏感离子通道介导细胞内钙离子水平升高,触动G蛋白偶联酪氨酸激酶磷酸化与促分裂原活化蛋白

激酶调节的级联反应,各信号分子之间存在网络样调控,最后导致转录因子的激活^[12]。机械力学对 MSCs 的影响具体到 MSCs 向平滑肌分化,有研究提出循环的张力通过激活平滑肌分化相关的生长因子受体如血小板衍生生长因子受体,导致了信号途径的激活,进而诱导 MSCs 的分化。力学因素对细胞的生长、增殖、分化有非常重要的影响,但对于细胞如何将力学信号转化为生物学信号了解甚少。探讨力学信号的转导机制是进一步认识生命活动规律的一个重要研究领域。

3.2.2 细胞外基质弹性对 MSCs 向平滑肌分化的影响 体内的组织从坚硬的骨到富有弹性的内皮黏膜,细胞生存在不同的细胞外基质中,基质的强度在一个很大的范围内变化,对于已分化的细胞来说,影响着细胞的粘附和细胞骨架的构成,细胞外基质的弹性对 MSCs 的分化同样起着重要的作用^[13]。细胞外基质的弹性影响细胞的伸展、粘附和细胞骨架的组装。基于此项理论,Engler 等^[14]在相同的培养条件下,将 MSCs 接种在涂布了胶原的聚丙烯酰胺凝胶上,凝胶的弹性强度分别模仿脑组织,肌肉组织和骨组织,结果发现接种在不同凝胶强度上的 MSCs 分别表达了早期神经源性的、肌源性的和骨源性的关键性的蛋白质标志,并且与一些利用化学诱导剂(如 DMSO)快速诱导细胞向另一种细胞形态改变不同,他们的细胞是在培养了 1~4 周后,才发生细胞表型的逐渐转变,符合细胞分化的规律。细胞感受基质弹性向一个特定的细胞系分化取决于两个方面,首先,细胞在分子水平能感觉到基质的弹性并有能力推动它,其次,细胞在使基质变形的作用力的基础上通过机械换能器来产生信号,激活向特定细胞分化的信号通路。非肌型的肌球蛋白 II 和粘附复合体在其中起着关键的作用,非肌型的肌球蛋白 II 与感受基质的弹性密切相关,而粘附复合体是对微环境的物理特性作出反应的主要决定中心^[15]。非肌型的肌球蛋白 II 可以改变肌动蛋白的结构,肌动蛋白结构的改变使之与粘附复合体结合,从而将细胞内的信号传送出细胞外。之前也已经指出细胞的形状和细胞骨架的紧张度可以通过 RhoA 信号通路调节 MSCs 的细胞系的决定,关于这一领域的研究还处于起步阶段,研究还没有深入开展,所以对于细胞信号转导的旁路知道的很有限。

体内的细胞都是生长在三维的组织结构中,因此除了细胞外基质的弹性及机械力的作用,将 MSCs 培养在一个立体环境中也是近年来研究的一个方面,

Valarmathi 等^[16]的研究已表明在三维环境的刺激有助于 MSCs 向平滑肌细胞的分化。三维培养是为了最大程度的模仿体内细胞生长的微环境,使细胞间形成适宜的空间分布和细胞连接;但是体内组织细胞生存的微环境是复杂的,立体环境并不是唯一的刺激因素,因此,要使组织工程组织更好的整合到体内三维的环境中,生化、机械和物理因素都必须一起考虑。综上所述,可以看出,细胞外基质并不通过单一某一个方面对 MSCs 的分化产生影响,而是通过细胞外基质中的多种组分与细胞表面受体的特异性结合,从而触发细胞内信号传递的某些连锁反应,影响细胞核基因的表达,最终表现为细胞的生存和功能状态及其表型性状的改变的。

3 前景与展望

虽然近年来对 MSCs 及其微环境的研究已取得很大的进展,但是人们还远没有达到可以选择和恒定在体外扩增组织特异性干细胞的能力,只有合理的安排或组织 MSCs 微环境中的各个因素如基质的弹性、形状、合适的氧分压、生长因子的梯度等,阐明各因素对 MSCs 定向分化的分子调控机制,何时启动所需路径的向靶细胞定向分化,最大限度的模仿干细胞的微环境,才能实现这一目标。此外,结构分化与功能分化也是在 MSCs 的研究中大家关注的问题,体外诱导分化的平滑肌细胞是不是具有功能的活体组织细胞,而不是仅仅表达相关的组织结构蛋白产物,这是一个研究中必须解决的问题。应当指出的是,MSCs 的生物学行为及其增殖与分化的调控机制相当复杂,在 MSCs 的增殖与分化方面,国内外学者作了不少探讨,但仍有许多问题等待解决。

参考文献(References)

- [1] Dominici M, Le Blance K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317
- [2] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life, *Cell*, 2008, 132(4): 598-611
- [3] Dellatore SM, Garcia AS, Miller WM, et al. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion, *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(5): 534-540
- [4] Mimeault M, Hauke R, Batra SK, et al. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies, *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(3): 252-264

- [5] Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM, *et al.* Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate, *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 714-727
- [6] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, *et al.* Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*, *Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125(6): 1470-1480
- [7] Yoon J, Shim WJ, Ro YM, *et al.* Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes, *Ann Hematol*, 2005, 84(11): 715-721
- [8] Alberti K, Davey RE, Onishi K, *et al.* Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate, *Nat Methods*, 2008, 5(7): 645-650
- [9] Phillippi JA, Miller E, Weiss L, *et al.* Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations, *Stem Cells*, 2008, 26(1): 127-134
- [10] Xie T, Li L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship, *Development*, 2007, 134(11): 2001-2006
- [11] Kobayashi N, Yasu T, Ueba H, *et al.* Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells, *Exp Hematol*, 2004, 32(12): 1238-1245
- [12] 黎润光, 邵景范, 魏明发. 机械力学对体外骨髓间充质干细胞的影响, *中国组织工程与临床康复*, 2007, 11(3): 551-554
- [13] Rehfeldt F, Engler AJ, Eckhardt A, *et al.* Cell responses to the mechanochemical microenvironment—implications for regenerative medicine and drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(13): 1329-1339
- [14] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, 2006, 126(4): 677-689
- [15] Ludwig T, Kirmse R, Poole K, *et al.* Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy, *Pflugers Arch*, 2008, 456(1): 29-49
- [16] Valarmathi MT, Yost MJ, Goodwin RL, *et al.* A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells, *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(4): 491-504

The Effect of Microenvironment on Mesenchymal Stem Cells Differentiation Directed to Smooth Muscle Cell

Xiao-Fang Liu, Yan-Zhou Wan, Hui-Cheng Xu, Zhi-Qing Liang*

(Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) have potential of multi-directional differentiation, which provided a wide application perspective for the stem cell therapy of smooth muscle injuries. but stem cell therapy can't attained expected effect because of some problem about stem cell differentiation *in vivo* have not resolved, the key point is how stem cell to adaptive the microenvironment *in vivo* when transplanted, and what is mechanism? Recent studies have revealed many factor about induce the smooth muscle differentiations of MSCs, such as grown factor, cell cell interact and effect of cell matrix *et al.*. This article was to review the microenvironment factor contain cell-cell interaction, the mechanical force, elasticity in cell matrix and three dimensions which effect on MSCs differentiation to smooth muscle cells.

Key words mesenchymal stem cells; microenvironment; smooth muscle cells

Received: December 19, 2008

Accepted: July 22, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772309, No.30801234)

*Corresponding author: Tel: 86-23-68754409, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com