

# 干细胞向骨骼肌细胞的诱导分化及其在治疗 骨骼肌病变中的应用

郭珊珊<sup>1</sup> 沈志森<sup>1,2\*</sup> 陆达锴<sup>1</sup> 巩长凤<sup>1</sup> 竺亚斌<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>宁波大学医学院, 宁波 315211; <sup>2</sup>宁波大学医学院附属李惠利医院, 宁波 315041)

**摘要** 随着干细胞技术、生物材料及组织工程技术的日趋发展, 专家和学者的研究不仅强调对细胞生长的调控及机制, 而且越来越注重其临床应用的潜能。运用组织工程和干细胞等技术重建和再生骨骼肌可以为肌肉相关疾病的治疗带来新的希望。干细胞是一类具有自我复制和多向分化潜能的细胞, 在合适的培养条件或给予合适的信号时, 干细胞可以分化为多种不同形态和功能的成熟细胞, 也因此骨骼肌重建和疾病治疗中得到广泛研究。该文就干细胞向骨骼肌细胞的分化及机制、干细胞作为骨骼肌组织工程的种子细胞以及在骨骼肌疾病治疗中的应用和前景作一综述。

**关键词** 干细胞; 骨骼肌; 组织工程; 临床应用

## Differentiation of Stem Cell into Skeletal Muscle Cell and Application Potentialities in Treating Impaired Skeletal Muscle Tissue

Guo Shanshan<sup>1</sup>, Shen Zhisen<sup>1,2\*</sup>, Lu Dakai<sup>1</sup>, Gong Changfeng<sup>1</sup>, Zhu Yabin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

<sup>2</sup>Lihuili Hospital of Medical School, Ningbo University, Ningbo 315041, China)

**Abstract** Stem cell is a cell type with the abilities of self-replication and multi-directional differentiation. As the development of technologies of stem cell, biomaterials and tissue engineering, researches are focusing on not only the regulation of cell proliferation and differentiation, but also attempts of clinical application. Constitution and remodeling of skeletal muscle using these technologies will be a promising treatment to cure patients with skeletal muscle diseases. Under appropriate culture conditions and signals' guidance, stem cells can differentiate into various types of mature cells with specific morphologies and functions. That is the reason why the stem cell is widely used as seeding cells in skeletal muscle reconstruction and even clinical attempt of disease treatment. This article gives a review about the differentiation of stem cells into skeletal muscle cells, the effects of chemical and physical factors on the differentiation and some *in vivo* evaluations and potential clinical applications to treat muscle diseases.

**Keywords** stem cell; skeletal muscle cell; tissue engineering; clinical application

收稿日期: 2014-04-03 接受日期: 2014-09-23

国家自然科学基金项目(批准号: 81171476、81471797)、宁波市重大科技攻关项目(批准号: 2012C5015)、宁波市科技创新团队项目(批准号: 2012B82019)、宁波市社发项目(批准号: 2013C50031)和宁波大学王宽诚教育基金资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0574-87018634, Fax: 0574-87392232, E-mail: szs7216@sina.com; Tel: 0574-87609592, Fax: 0574-87609638, E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

Received: April 3, 2014 Accepted: September 23, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171476, 81471797), Major Scientific Research Project of Ningbo (Grant No.2012C5015), Scientific Innovation Team Project of Ningbo (Grant No.2012B82019), Social Development Project of Ningbo (Grant No.2013C50031) and K. C. Wong Education Foundation of Ningbo University

\*Corresponding authors. Tel: +86-574-87018634, Fax: +86-574-87392232, E-mail: szs7216@sina.com; Tel: +86-574-87609592, Fax: +86-574-87609638, E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2014-12-29 11:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141229.1106.002.html>

骨骼肌是人类机体最丰富的组织,具有协调运动的功能,并具有一定的再生能力。中胚层的成肌细胞快速分裂融合成肌管,然后形成多核的骨骼肌细胞,肌细胞成束后形成肌纤维。胚胎发育五个月时,肌纤维即可生成蛋白丝用于肌肉收缩。当肌纤维聚集成束,成肌细胞也就进入了静止状态<sup>[1]</sup>。

创伤、肿瘤以及长期去神经所造成的骨骼肌损伤已成为一种常见的临床疾病。尽管肌纤维有再生能力,但是肌肉损伤后形成的致密纤维瘢痕会对肌肉的功能造成影响。这可能是由于肌纤维损伤后转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)升高,诱导肌源性干细胞(muscle derived stem cells, MDSCs)和其他生肌细胞向肌成纤维母细胞分化所致<sup>[2-3]</sup>。Foster等<sup>[4]</sup>研究证明,干扰素 $\gamma$ (interferon  $\gamma$ ,  $\gamma$ IFN)可以降低纤维化的水平,成肌细胞在含 $\gamma$ IFN(1 000 U/mL)的培养基中培养72 h后表达TGF- $\beta$ 的量与对照组相比明显降低,说明 $\gamma$ IFN有助于减少纤维瘢痕的形成,但这种方法容易产生寒战发热、骨髓抑制和一过性肝损伤等毒副作用。除肌肉损伤外,肌营养不良也是一种常见的肌肉相关疾病,它由抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因缺陷及其蛋白产物缺失引起。抗肌萎缩蛋白将肌细胞的细胞外基质与细胞骨架连接起来,以维持肌肉收缩时细胞膜的稳定性。如果抗肌萎缩蛋白缺乏可导致与抗肌萎缩蛋白相关蛋白复合物形成障碍,使肌纤维膜的完整性破坏,肌膜脆性增加,尤其在肌肉持续性收缩之后,肌膜完整性的破坏更加明显,从而使肌肉连续收缩能力明显下降。这种情况下,以单纯骨骼肌细胞或基因替换治疗肌营养不良的策略是不可行的,因为不能完全修复数以万计的骨骼肌细胞<sup>[5]</sup>。对于肌营养不良、心脏衰竭和膀胱压力性尿失禁等方面的病变,已有一些报道关于尝试运用干细胞或以干细胞为种子细胞的组织工程技术来治疗这些疾病的可行性。

对于骨骼肌组织工程来说,目前的研究主要集中在骨骼肌卫星细胞的应用。骨骼肌卫星细胞是一种存在于基膜与肌细胞膜之间的单核细胞,正常情况下处于静止状态。当肌肉受到损伤时,卫星细胞被激活而开始增殖,并在向肌组织迁移的同时,部分向成肌细胞分化。分化的部分与自身或受损的肌纤维相融合,而未分化的部分仍然保持静止状态以备

后需<sup>[6]</sup>。但骨骼肌组织工程的研究目前处于起步和发展阶段,在临床上广泛应用还为时尚早,诸如干细胞的增殖、干性维持、分化机制、临床上的手术要求、病人的个体差异以及治疗后的远期效果等问题都还不是十分清楚。本文就不同种类干细胞向骨骼肌细胞的分化及机制以及干细胞在治疗骨骼肌疾病中的潜在应用作一综述。

## 1 干细胞向骨骼肌细胞的诱导分化

干细胞根据所处的发育阶段的不同分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)和成体干细胞(somatic stem cell)。随着对成熟细胞重编程的研究,发现通过导入外源基因的方法也能使成熟了的体细胞去分化为多能干细胞,于是科学家们又提出了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS细胞)。另一方面,根据细胞的发育潜能可将干细胞分为全能干细胞(totipotent stem cell, TSC)、多能干细胞(pluripotent stem cell and multipotent stem cell)和单能干细胞(unipotent stem cell)。全能干细胞可以分化为任意的细胞和组织,从而产生一个新的有机整体,胚胎干细胞就属于这一种。多能干细胞则是可以分化为三个胚层的细胞,它与全能干细胞的区别在于没有分化为胚胎外组织细胞(如滋养层形成的胎盘和脐带组织)的能力。成体多能干细胞通常只能形成局限于一个特定胚层的一定数量的细胞或组织。通常可以从人体骨髓中获取,偶尔也可见于脂肪、皮肤、骨膜和肌肉等组织<sup>[7]</sup>。此外,还有一类特殊的成体多能干细胞称为祖细胞,其特性是可以分化为具有明确特征的目标细胞,而且其分裂次数有限。在合适的化学和物理条件下,上述干细胞可以用来被分化为骨骼肌细胞。除此之外,早孕绒毛膜绒毛衍生细胞(first-trimester chorionic-villi-derived cells, FTCVs)<sup>[8]</sup>、羊水干细胞<sup>[9]</sup>、脐带干细胞<sup>[10]</sup>、胎盘血管周围细胞<sup>[11]</sup>、来源于滑膜和骨髓等的间充质干细胞<sup>[12-13]</sup>、脂肪干细胞<sup>[14]</sup>和骨骼肌卫星细胞等也被报道可以向骨骼肌细胞转化。

肌细胞的分化受到多种因子调控,其中成肌调节因子MRFs家族(包括MyoD、Myf5、MRF4、Myogenin等4个因子)起着重要作用。MRFs编码的蛋白都具有基本的螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构,都有一个类似c-myc的结构域,即E盒(CANNTG),能与骨骼肌特异性基因启动子上的

某一特定的DNA序列结合,从而激活这些骨骼肌特异性基因使之编码相应的蛋白。MRFs的4个成员在肌肉发生过程中的表达具有一定的时间和空间规律,其中MyoD和Myf5在干细胞分化为成肌细胞过程中起着主导作用,而Myogenin在肌纤维的成熟及形态方面起重要作用。MRFs与多种骨骼肌特异基因上游启动子和增强子结合,通过反式激活作用,促进骨骼肌发育及肌特异基因如肌球蛋白、肌肉肌酸激酶(muscle creatine kinase, MCK)、乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, *AchR*)等基因的表达<sup>[1]</sup>。干细胞在分化为骨骼肌细胞时受到许多因素的影响。

### 1.1 化学因素的影响

化学因素主要包括生长因子、激素和一些核苷类似物等化学因子,这些化学因子互为因果,通过调节细胞分化相关蛋白的水平促进细胞的分化和成熟。如Haghighipour等<sup>[15]</sup>用含有胰岛素样生长因子-1(IGF-1, 9 ng/mL)的培养基培养人的骨髓间充质干细胞,以实时定量PCR(RT-PCR)检测肌源性调节因子Myf5、MyoD和MyoG的mRNA转录水平,发现明显增高,其中Myf5和MyoD基因表达早但表达量下降快,而MyoG基因表达晚,说明Myf5和MyoD与肌发生的增生期有关,而MyoG主要参与终末分化。Sassoli等<sup>[16]</sup>将小鼠骨髓间充质干细胞与成肌细胞共同培养,间充质干细胞通过旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)增强成肌细胞的活性和增殖能力,成肌细胞内血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的酪氨酸磷酸化水平显著增高,Notch-1及其配体Jagged-1的表达也同时增高。这也表明了VEGF通过参与Notch-1信号传导途径介导基因转录。

来源于成体干细胞的脂肪干细胞(adipose stem cells, ASCs)也有向骨骼肌细胞分化的潜能。Kim等<sup>[17]</sup>用含氢化可的松的培养基培养ASCs,用免疫荧光和RT-PCR检测到肌源性标记物MyoD和骨骼肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)及类似肌管的多核结构。而后将经VEGF处理和不经处理的ASCs分别移植入小鼠体内,发现处理组新生肌组织的出现早且范围广。用免疫荧光对新生血管进行检测时,发现平滑肌肌动蛋白- $\alpha$ (smooth muscle actin- $\alpha$ , SMA- $\alpha$ )表达比对照组明显增高。以上说明VEGF能够促进ASCs向骨骼肌细胞分化,同时能够促进血管形成<sup>[17]</sup>。

Fatma等<sup>[18]</sup>比较了骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞和骨骼肌卫星细胞的增殖和分化的特点。从增殖角度,脂肪干细胞增殖速率最高,骨骼肌卫星细胞次之,骨髓间充质干细胞最低。如果同时以氮杂胞苷作为诱导剂,卫星细胞表达肌细胞生成素的量可达93%,骨髓间充质干细胞为83.3%,脂肪干细胞为77%,也即骨骼肌卫星细胞显示了最高的诱导分化效率。因此,我们认为骨骼肌卫星细胞是较好的骨骼肌种子细胞。

### 1.2 物理因素的影响

以上主要探讨了化学因子对干细胞分化为骨骼肌细胞的诱导作用及影响因素,但除了化学因子的影响,物理因素有时也会对细胞产生明显的影响,有时甚至是主要的影响因子。自从1978年Schofield<sup>[19]</sup>提出“Niche”的概念后,大家真正地意识到物理微环境对于干细胞的诱导作用的重要性。Niche在哺乳动物骨髓、皮肤、肠、脑和骨骼肌方面的重要性也逐步得到认可<sup>[20-22]</sup>。肌细胞是一类与其他细胞具有很大不同的细胞,其梭形的细胞结构使肌细胞呈现狭长的形态,肌细胞的收缩功能使其处于持续的动态牵拉刺激中,梭形结构和牵拉刺激是影响肌细胞功能的两个至关重要的物理因素<sup>[23]</sup>,也是体外成功构建工程化骨骼肌组织非常重要的因素。很多人从模拟具有相应细胞外基质结构的支架入手,辅以外源的力学刺激。如Wang等<sup>[24]</sup>以聚己内酯为基材制备带微槽的立体支架,将人骨髓间充质干细胞培养于其上并辅以沿微槽方向的单轴牵拉刺激。两周后,发现经外力牵拉的支架上细胞有序排列达85%以上,与对照组相比细胞伸长明显;免疫荧光也显示细胞表达肌源性标记物的水平比对照组高。说明牵拉刺激能够促进间充质干细胞向骨骼肌细胞分化。

支架作为细胞生长的支撑物,在细胞的增殖和分化中也具有重要的作用。支架通过细胞膜上的一类跨膜糖蛋白如整合素对细胞产生作用。整合素是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两种亚基组成的多功能蛋白复合体,通过向细胞内传递信号来调节细胞的迁移、增殖和分化过程。在骨骼肌卫星细胞上,整合素亚基 $\alpha 4$ (integrin  $\alpha 4$ , ITG $\alpha 4$ )、ITG $\alpha 5$ 和ITG $\beta 1$ 为纤连蛋白受体,ITG $\alpha 6$ 、ITG $\alpha 7$ 和ITG $\beta 1$ 是层黏连蛋白受体,它们都通过Notch和Wnt通路传递信号。Wilschut等<sup>[25]</sup>将猪的骨骼肌卫星细胞分别接种在由层黏连蛋白、人工



基底膜、I型胶原、纤连蛋白和明胶等不同蛋白质表面涂层的支架上,光镜下可见在层黏连蛋白和人工基底膜涂层的支架表面上形成的细胞簇更多,RT-PCR和免疫荧光也显示在层黏连蛋白和人工基底膜的支架上细胞表达基因*PAX7*(paired box 7)、*Myf5*和*MyoD*的水平比分别涂层I型胶原、纤连蛋白和明胶的支架上,的细胞显著增高。故得出结论,层黏连蛋白和人工基底膜更能促进骨骼肌卫星细胞的增殖和分化。

生物支架的结构可以是二维或三维的,传统的体外细胞培养通常在二维的培养皿中进行。但肌细胞在体内呈排列有序的立体肌细胞束,二维的培养条件对三维的骨骼肌并不适合。于是有人想到了运用图案化支架或电纺丝技术以获得有序排列的肌纤维。Huang等<sup>[26]</sup>用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)为模具,制备了一种带微槽的立体支架,在微槽内种植并培养骨骼肌卫星细胞。免疫荧光染色显示,细胞沿着槽的方向排列,并逐渐融合形成肌管,他们认为微槽结构有利于骨骼肌细胞的取向,从而促进细胞的分化。另外,运用电纺丝技术得到的有序排列纤维,也可以引导体外培养骨骼肌细胞沿纤维方向生长。Hong等<sup>[27]</sup>以聚乳酸为基材,运用电纺丝技术制成有序排列的纳米纤维支架,将骨髓间充质干细胞种植其上,在含有血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF) 5 ng/mL和转化生长因子(TGF- $\beta$ 1) 2.5 ng/mL的培养基中培养15 d后,发现细胞表达肌连接蛋白(Desmin)的水平比普通支架上的细胞高,证明纳米纤维促进了间充质干细胞向肌细胞的分化。

Koning等<sup>[28]</sup>采用多层细胞复合的技术获得三维肌组织。他们首先以聚(N-异丙基丙烯酰胺)制成平面膜,将成肌细胞培养其上,培养5 d后,利用材料对温度敏感,如温度降到20 °C时聚丙烯酰胺膜收缩,细胞从支架上脱离。重复上述操作,可得到多层细胞膜片。但此技术的缺点是成肌细胞的厚度不能超过150  $\mu$ m,否则细胞不能正常生长,这可能与营养供应不足有关。

我们课题组正在研究运用组织工程技术构建工程化骨骼肌,以期修复或替代病变或缺损的咽及下咽组织。我们以生物可降解聚合物为基材,首先制备具有合适尺寸的三维微槽结构,运用化学方法,将提取自蚕茧的天然丝素蛋白接枝于支架表面,从

人咽部(患者知情同意)提取骨骼肌卫星细胞,经体外扩增后种植于上,发现经化学接枝的丝素蛋白以及三维微槽结构有利于下咽骨骼肌细胞的生长和分化,动物体内实验证实这样的细胞/支架复合体具有良好的组织相容性<sup>[29-31]</sup>。更长期的骨骼肌组织在体外和动物体内的工程化重构和再生的研究仍在进行中。

## 2 干细胞技术在骨骼肌疾病治疗上的基础和临床试验

### 2.1 肌营养不良

肌营养不良是一类以进行性肌无力和肌萎缩为特征的疾病,有贝克氏和杜氏两种分型,其中杜氏型在20岁之前就会出现瘫痪甚至死亡。传统的临床治疗方法都是用皮质类固醇激素抑制免疫反应,但这种方法效果不太显著,且长期应用存在诱发或加重感染、白内障、青光眼、骨质疏松和椎骨压迫性骨折以及心血管和消化系统等各种并发症的危险。

近年来,转基因、干细胞技术的发展为肌萎缩的治疗带来了希望。Kacoeffe等<sup>[32]</sup>用腺病毒载体将*MyoD*基因导入人脐带间充质干细胞,然后与小鼠成肌细胞共培养,5 d后显示细胞开始融合,Western blot检测发现,转染后的细胞表达抗肌萎缩蛋白(dystrophin)的水平比未转染的细胞高。Cassano等<sup>[33]</sup>将由肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)演变而来的*Magic-factor-1*基因导入肌营养不良小鼠体内,4周后小鼠运动功能明显改善,组织切片显示肌细胞增大,Western blot也显示细胞表达肌球蛋白重链水平增高。说明*Magic-factor-1*能够抑制细胞凋亡,促进细胞分化和存活。

脂肪干细胞(ASCs)也被用于肌营养不良的治疗实验。Rocco等<sup>[34]</sup>将从绿色荧光蛋白阳性小鼠脂肪组织中分离的细胞(AT-SVF细胞)注入小鼠骨骼肌,发现AT-SVF细胞融合入肌纤维高达体内总体积的20%,且大约有10%的肌纤维表达抗肌萎缩蛋白,这表明移植的AT-SVF细胞能有效促进骨骼肌的再生。脂肪干细胞在动物体内实验中也得到了正向结果。

Rodriguez等<sup>[35]</sup>将人ASCs注入肌营养不良小鼠的胫前肌内,10 d后可以检测到人抗肌萎缩蛋白阳性的肌纤维。Vieira等<sup>[36]</sup>用流式细胞术检测ASCs表面抗原得到,ASCs上人白细胞抗原I(human

leukocyte antigen I, HLA I)分子阳性表达、HLA II分子阴性表达,认为应用同种异体的脂肪干细胞治疗肌营养不良萎缩是可行而有效的。

上述实验采用的是原位肌肉注射脂肪干细胞。而 Vieira等<sup>[37]</sup>将人的脂肪干细胞通过静脉注入四肢和腹部肌萎缩的小鼠体内,在没有进行免疫抑制的情况下,细胞没有发生明显排异反应。另一方面,人脂肪干细胞与小鼠的肌肉融合良好,形成了人类/鼠嵌合型肌纤维,并大量表达人抗肌萎缩蛋白,小鼠的运动能力也得到明显改善。干细胞治疗肌营养不良,在体外和动物体内的实验均得到了正向结果,预期良好,但目前还未见到有关人体内实验和临床应用的报道。

## 2.2 心脏衰竭

心肌细胞与骨骼肌细胞相似,都属于横纹肌,具有由肌动蛋白和肌球蛋白构成的肌节。但不同的是,心肌细胞通过缝隙连接传递电冲动。肌卫星细胞被认为是比较适合治疗心力衰竭的肌源性细胞,因为它们易于从病人体内获取并迅速在体外扩增,然后移植回患者心脏<sup>[38]</sup>。

Menasche等<sup>[39]</sup>在患者的左心室注入自体成肌细胞,6个月后患者的左心室射血分数(每搏输出量占心室舒张末期容积的百分比,反应心肌的收缩能力)和收缩末期容积(左心室收缩后的最小容积,反应左心室的功能)增加,心衰症状得到改善。但部分例子在治疗后出现了频发室性心动过速,此问题是否因成肌细胞引起还需要作进一步研究。

自从 Okano研究组<sup>[40-41]</sup>提出细胞膜片技术(cell sheet technology)后,这一技术也被尝试用于治疗心脏疾病。如 Narita等<sup>[42]</sup>采用细胞膜片移植技术,并与直接注射法作比较。他们首先将小鼠成肌细胞在温敏型培养皿(由N-异丙基丙烯酰胺制成)中在37℃下孵育12~15 h,然后将温度降至22℃,得到一层直径约为15 mm的细胞膜片。然后将此细胞膜片移植于小鼠梗死区及交界区的心外膜下,1个月后检测小鼠的心功能,发现心动过速的发生率较直接注射组显著降低,存活的细胞数量增多。Lascio等<sup>[43]</sup>将小鼠成肌细胞(C2C12)与松弛素同时注入小鼠体内,2个月后对小鼠进行超声心动图及正电子发射层析分析,显示联合治疗组较单独应用成肌细胞组的小鼠心功能明显改善,可收缩心肌细胞数量增加,成肌细胞迁移至缺血性瘢痕形成的心肌处也更加明显。Chen等<sup>[44]</sup>和

Yeh等<sup>[45]</sup>对细胞膜片技术进行了改进,他们分别将间充质干细胞或羊水干细胞做成的细胞膜片打散成细胞碎片直接注入小鼠心脏受损处,发现使小鼠的心脏功能得到增强,这可能由于细胞碎片保留的细胞外基质有利于维持细胞功能。

Kharaziha等<sup>[46]</sup>将组织工程技术应用于心脏衰竭的治疗。他们将聚丙三醇癸二酸酯[poly(glycerol-sebacate), PGS]与明胶混合,通过电纺技术制成纳米纤维支架,将小鼠心肌细胞接种于上。当PGS与明胶的质量比为33:67时,所制得的纤维支架能够诱导心肌细胞同步收缩。这为移植后心肌收缩功能的恢复带来了希望。Lilyanna等<sup>[47]</sup>则以纤维蛋白为支架材料,与小鼠脊髓间充质干细胞复合培养,在网膜瓣的联合应用下,将复合物移植入小鼠体内,6周后小鼠的左心室舒张末压、左心室收缩压及射血分数有明显改善,小动脉的密度也明显增高。这为促进心肌组织的血管生成开辟了新的道路。Chen等<sup>[48]</sup>以PGS为基材,与胚胎干细胞膜片复合制成心脏补片,植入病变处后发现有利于细胞维持其活力和收缩功能,植入2周后补片保持完整,心脏收缩功能得到维持。上述这些实验为干细胞治疗心脏疾病提出了新的思路和技术,但目前这些技术还处于动物实验阶段,要真正应用于临床还需解决诸如材料选择、技术方案、细胞功能等诸多问题。

## 2.3 压力性尿失禁等

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)是临床上常见的疾病,其原因主要是肌肉、结缔组织和神经损伤引起<sup>[49]</sup>。传统的治疗方法如盆底肌训练、药物治疗和手术疗法等,但成功率较低。干细胞治疗尝试主要集中在增加尿道横纹括约肌的活力和数量等方面,因为括约肌在控制排尿中具有重要作用。尿道横纹括约肌的控尿功能既精细又复杂,既需要在静息状态下保持基础收缩使尿道压总是高于膀胱内压,又需要在咳嗽、喷嚏等腹腔压力增加时快速收缩关闭尿道,甚至在睡眠状态仍保持一定的基础张力。

Mitterberger等<sup>[50-51]</sup>在不断改进实验方法和扩大样本量的基础上,将自体成肌细胞注入123例SUI病人的尿道横纹括约肌,将成纤维细胞注入尿道黏膜下层,进行为期一年的随访显示,78%的病人完全治愈,13%的病人得到实质性的改善,另有8%的病人症状稍微改善或改善不明显。Strasser等<sup>[52-53]</sup>采用同

样的技术,对63位病人进行为期一年的研究,治愈率达79%,19%的病人明显改善,只有2%的病人稍微改善或改善不明显。也有研究显示,脂肪干细胞在SUI的治疗中有一定的效果,如Yamamoto等<sup>[54]</sup>对2位病人进行自体脂肪干细胞提取并注入尿道黏膜下层和横纹括约肌内,12周后发现最大尿道闭合压力增加,注射部位血流量也明显增加。

## 2.4 骨骼肌失神经萎缩

骨骼肌的发生、功能和结构的维持都受到运动神经的支配和调节,一旦失去神经支配,将丧失收缩功能,肌肉体积减少,肌纤维逐渐萎缩,并逐渐被结缔组织所替代。失神经支配骨骼肌的萎缩既是失营养性萎缩又是废用性萎缩,只有重新获得再支配才是防止肌萎缩的最佳方案。但神经再生的速度极为缓慢,即使周围神经损伤得到修复,轴突也往往需要相当长的时间才能到达周围靶器官,某些失神经支配骨骼肌在神经再生运动终板前已发生了不可逆的萎缩和变性,使功能恢复受到影响。因此,积极延缓失神经支配骨骼肌的萎缩速度是神经修复后功能恢复的关键<sup>[55]</sup>。

骨骼肌失神经后,其肌卫星细胞的数量随失神经时间的延长而迅速下降,但在失神经早期,肌卫星细胞数量会增加,这些增生的肌卫星细胞再生形成的类似肌管的结构,将来不会发育成成熟的肌纤维,其结果导致了肌卫星细胞的消耗。对于长期骨骼肌失神经支配导致的骨骼肌不可逆肌萎缩,肌卫星细胞库的耗竭可能是一个重要原因<sup>[56]</sup>。

Yohn等<sup>[57]</sup>将小鼠胚胎干细胞衍生而来的运动神经元注入横断的坐骨神经内。2个月后对神经支配的肌肉进行肌电图检测,发现肌肉颤动较未注射组明显增加。组织学检测也显示,干细胞衍生的运动神经元能够形成神经肌肉连接。Gu等<sup>[58]</sup>将小鼠胚胎源神经干细胞注入横断的胫神经内,3、5及7个月后腓肠肌的干重及肌纤维的分布面积均较对照组高,胫神经末梢的神经原仍然存在,且有新生的神经肌肉接头产生。电生理分析显示,肌肉与神经原之间的神经通路完整。

Lin等<sup>[59]</sup>应用转基因技术将基因神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)通过慢病毒转染至鼠胚胎脊髓源神经干细胞,并将其注入事先切断胫神经的小鼠体内,4周后行免疫组化染色、RT-PCR、Western blot、电生理分析和腓肠肌平均横截面面积

等检测,显示在NT-3转染干细胞治疗组的小鼠胆碱乙酰转移酶阳性细胞显著增高,肌肉萎缩的情况得到延缓。即内源性表达NT-3的神经干细胞比普通神经干细胞具有更好的延缓失神经骨骼肌萎缩的功。而且发现在神经切断1周后行干细胞移植术,对阻止或延缓失神经骨骼肌萎缩的效果最好<sup>[60]</sup>。

Lee等<sup>[61]</sup>采用生物材料如聚己内酯(polycaprolactone, PCL)和I型胶原通过电纺丝技术做成中空的神导管,将邻近未受损的坐骨神经胫骨分支和腓骨总神经断端相连接(端至侧吻合),8周后轴突连续性得到修复。20周以后,胫骨分支神经支配的骨骼肌功能也得到修复。由此得出结论,在自体神经移植或近端神经残肢不可得的情况下,ETS联合电纺丝PCL/胶原导管是一种可行的修复失神经肌损伤的方法。

## 3 总结

干细胞作为组织修复和再生的一种种子细胞,尽管在骨、软骨、肌腱和韧带等方面的研究已经有了迅速的发展,但在骨骼肌损伤治疗上的应用才刚刚展开。胚胎干细胞、成体干细胞以及肌卫星细胞向骨骼肌细胞的分化特性以及分化机制正在引起越来越多的关注。但是到目前为止,干细胞及其治疗技术仍然主要处于细胞培养、增殖、分化及机制等基础研究阶段,动物体内实验对肌营养不良、心力衰竭和压力性尿失禁等骨骼肌相关疾病的治疗开始出现探索性实验,而临床上仅限于个别案例的初步尝试。我们认为,把基因技术、干细胞技术、生物材料以及组织工程技术结合起来,将在骨骼肌疾病治疗中体现良好的应用前景。

## 参考文献 (References)

- 1 Yusuf F, Brand-Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol* 2012; 138(2): 187-99.
- 2 Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol* 2002; 161(3): 895-907.
- 3 Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type 1 collagen gene expression: Implication in fibrosis. *Exp Biol Med* 2002; 227(5): 301-14.
- 4 Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res* 2003; 21(5): 798-804.
- 5 Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: Challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol*



- Med 2007; 13(12): 520-6.
- 6 Ūsas A, Mačiulaitis J, Mačiulaitis R, Jakubonienė N, Milašius A, Huard J. Skeletal muscle-derived stem cells: implications for cell-mediated therapies. *Medicina (Kaunas)* 2011; 47(9): 469-79.
- 7 Shand J, Berg J, Bogue C. Human embryonic stem cell (hESC) and human embryo research. *Pediatrics* 2012; 130(5): 972-7.
- 8 Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissu Res* 2012; 348(1): 189-97.
- 9 Kim BS, Chun SY, Lee JK, Lim HJ, Bae JS, Chung HY, *et al.* Human amniotic fluid stem cell injection therapy for urethral sphincter regeneration in an animal model. *BMC Med* 2012; 10(1): 94.
- 10 Liu J, Xu HK, Zhou HZ, Weir MD, Chen QM, Trotman CA. Human umbilical cord stem cell encapsulation in novel macroporous and injectable fibrin for muscle tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2013; 9(1): 4688-97.
- 11 Park TS, Gavina M, Chen CW, Sun B, Teng PN, Huard J, *et al.* Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells Dev* 2011; 20(3): 451-63.
- 12 De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymakers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160(6): 909-18.
- 13 Kim MH, Kino-oka M, Saito A, Sawa Y, Taya M. Myogenic induction of human mesenchymal stem cells by culture on dendrimer-immobilized surface with d-glucose display. *J Biosci Bioeng* 2010; 109(1): 55-61.
- 14 王伟, 撒亚莲, 严新民. 脂肪源性干细胞的定向分化潜能及临床应用前景. *中华临床医师杂志 (Wang Wei, Sa Yalian, Yan XinMing. The differentiation potential and clinical application prospect of adipose-derived stem cells. Chin J Clinicians)* 2011; 5(2): 461-4.
- 15 Haghighipour N, Heidarian S, Shokrgozar MA, Amirizadeh N. Differential effects of cyclic uniaxial stretch on human mesenchymal stem cell into skeletal muscle cell. *Cell Biol Int* 2012; 36(7): 669-75.
- 16 Sassoli C, Pini A, Chellini F, Mazzanti B, Nistri S, Nosi D, *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PLoS One* 2012; 7(7): e37512.
- 17 Kim MH, Hong HN, Hong JP, Park CJ, Kwon SW, Kim SH, *et al.* The effect of VEGF on the myogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells within thermosensitive hydrogel matrices. *Biomaterials* 2010; 31(6): 1213-8.
- 18 Meligy FY, Shigemura K, Behnsawy HM, Fujisawa M, Kawabata M, Shirakawa T. The efficiency of *in vitro* isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012; 48(4): 203-15.
- 19 Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4(1/2): 7-25.
- 20 Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116(6): 769-78.
- 21 Jones DL, Wagers AJ. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 11-21.
- 22 Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311(5769): 1880-5.
- 23 Cosgrove BD, Sacco A, Gilbert PM, Blau HM. A home away from home: Challenges and opportunities in engineering *in vitro* muscle satellite cell niches. *Differentiation* 2009; 78(2/3): 185-94.
- 24 Wang ZY, Teo EY, Chong MSK, Zhang QY, Lim J, Zhang ZY, *et al.* Biomimetic three-dimensional anisotropic geometries by uniaxial stretch of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films for mesenchymal stem cell proliferation, alignment, and myogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 2013; 19(7): 538-49.
- 25 Wilschut KJ, Haagsman HP, Roelen BA. Extracellular matrix components direct porcine muscle stem cell behavior. *Exp Cell Res* 2010; 316(3): 341-52.
- 26 Huang NF, Thakar KG, Wong M, Kim D, Lee RJ, Song L. Tissue engineering of muscle on micropatterned polymer films. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2004; 2: 4966-9.
- 27 Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma HY, Ma PX, Atala A, *et al.* Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(5): 870-7.
- 28 Koning M, Harmsen MC, van Luyn MJ, Werker PM. Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering. *J Tissu Eng Regen Med* 2009; 3(6): 407-15.
- 29 陈静静, 沈志森, 巩长凤, 康 骋, 竺亚斌. 骨骼肌卫星细胞的培养及其在骨骼肌组织工程研究中的应用. *中国生物医学工程学报 (Chen Jingjing, Shen Zhisen, Gong Changfeng, Kang Cheng, Zhu Yabin. Culture and identification of skeletal muscle satellite cell for skeletal tissue engineering research. Chin J Biomed Eng)* 2011; 30(6): 116-21.
- 30 Shen ZS, Guo SS, Ye D, Chen JJ, Kang C, Qiu SJ, *et al.* Skeletal muscle regeneration on protein-grafted and microchannel-patterned scaffold for hypopharyngeal tissue engineering. *BioMed Res Int* 2013; 146953.
- 31 Shen ZS, Kang C, Chen JJ, Ye D, Qiu SJ, Guo SS, *et al.* Surface modification of polyurethane towards promoting the *ex vivo* cytocompatibility and *in vivo* biocompatibility for hypopharyngeal tissue engineering. *J Biomater Appl* 2013; 28(4): 607-16.
- 32 Kocaefe C, Balci D, Hayta BB, Can A. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev* 2010; 6(4): 512-22.
- 33 Cassano M, Biressi S, Finan A, Benedetti L, Omes C, Boratto R, *et al.* Magic-factor 1, a partial agonist of Met, induces muscle hypertrophy by protecting myogenic progenitors from apoptosis. *PLoS One* 2008; 3(9): e3223.
- 34 Rocco GD, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, *et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006; 119: 2945-52.
- 35 Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005; 201(9): 1397-405.
- 36 Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Jazedje T, Secco M, Nunes VA, *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells restore

- dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells *in vitro*. *Biol Cell* 2008; 100(4): 231-41.
- 37 Vieira NM, Bueno CR, Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, *et al*. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2391-8.
- 38 Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(1): 11-9.
- 39 Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, *et al*. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008; 117(9): 1189-200.
- 40 Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J Control Release* 2005; 101(1-3): 69-84.
- 41 Matsuda N, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Tissue engineering based on cell sheet technology. *Adv Mater* 2007; 19(20): 3089-99.
- 42 Narita T, Shintani Y, Ikebe C, Kaneko M, Harada N, Tshuma N, *et al*. The use of cell-sheet technique eliminates arrhythmogenicity of skeletal myoblast-based therapy to the heart with enhanced therapeutic effects. *Int J Cardiol* 2013; 168(1): 261-9.
- 43 Lascio GD, Harmelin G, Targetti M, Nanni C, Bianchi G, Gasbarri T, *et al*. Cellular retrograde cardiomyoplasty and relaxin therapy for postischemic myocardial repair in a rat model. *Tex Heart Inst J* 2012; 39(4): 488-99.
- 44 Chen CH, Chang Y, Wang CC, Huang CH, Huang CC, Yeh YC, *et al*. Construction and characterization of fragmented mesenchymal-stem-cell sheets for intramuscular injection. *Biomaterials* 2007; 28(31): 4643-51.
- 45 Yeh YC, Lee WY, Yu CL, Hwang SM, Chung MF, Hsu LW, *et al*. Cardiac repair with injectable cell sheet fragments of human amniotic fluid stem cells in an immune-suppressed rat model. *Biomaterials* 2010; 31(25): 6444-53.
- 46 Kharaziha M, Nikkhah M, Shin SR, Annabi N, Masoumi N, Gaharwar AK, *et al*. PGS: Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. *Biomaterials* 2013; 34(27): 6355-66.
- 47 Lilyanna S, Martinez EC, Vu TD, Ling LH, Gan SU, Tan AL, *et al*. Cord lining-mesenchymal stem cells graft supplemented with an omental flap induces myocardial revascularization and ameliorates cardiac dysfunction in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(11/12): 1303-15.
- 48 Chen QZ, Ishii H, Thouas GA, Lyon AR, Wright JS, Blaker JJ, *et al*. An elastomeric patch derived from poly (glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart. *Biomaterials* 2010; 31(14): 3885-93.
- 49 Proaño AR, Medrano A, Garrido G, Mazza O. Muscle-derived stem cell therapy for stress urinary incontinence. *Actas Urol Esp* 2010; 34(1): 15-23.
- 50 Mitterberger M, Pinggera GM, Marksteiner R, Margreiter E, Fussenegger M, Frauscher F, *et al*. Adult stem cell therapy of female stress urinary incontinence. *Eur Urol* 2008; 53(1): 169-75.
- 51 Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, *et al*. Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: A 1-year follow-up in 123 patients. *BJU Int* 2007; 100(5): 1081-5.
- 52 Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Mitterberger M, Frauscher F, *et al*. RETRACTED: Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: A randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369(9580): 2179-86.
- 53 Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Mitterberger M, Pinggera GM, Frauscher F, *et al*. Transurethral ultrasonography-guided injection of adult autologous stem cells versus transurethral endoscopic injection of collagen in treatment of urinary incontinence. *World J Urol* 2007; 25(4): 385-92.
- 54 Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, *et al*. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. *Int J Urol* 2010; 17: 75-82.
- 55 Rodrigues AD, Schmalbruch H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscle. *Anat Rec* 1995; 243(4): 430-7.
- 56 Liao H, Wang Q, Xu D, Qiu X, Yu L, Ouyang J. Pax7 and depletion of satellite cell pool in prolonged denervated skeletal muscles of adult rats. *J Rep Rec Surg* 2009; 23(1): 92-6.
- 57 Yohn DC, Miles GB, Rafuse VF, Brownstone RM. Transplanted mouse embryonic stem-cell-derived motoneurons form functional motor units and reduce muscle atrophy. *J Neurosci* 2008; 28(47): 12409-18.
- 58 Gu SH, Shen YD, Xu WD, Xu L, Li XK, Zhou GM, *et al*. Application of fetal neural stem cells transplantation in delaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury. *Microsurgery* 2010; 30(4): 266-74.
- 59 Lin S, Xu JG, Hu SN, Xu L, Zhang CQ, Wang Y, *et al*. Combined application of neutrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to delay of denervated skeletal muscular atrophy after tibial nerve transection in rats. *Cell Transplant* 2011; 20(3): 381-90.
- 60 Lin S, Xu L, Hu SN, Zhang CQ, Wang Y, Xu JG. Optimal time-point for neural stem cell transplantation to delay denervated skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2013; 47(2): 194-201.
- 61 Lee BK, Ju YM, Cho JG, Jackson JD, Lee SJ, Atala A, *et al*. End-to-side neurorrhaphy using an electrospun PCL/collagen nerve conduit for complex peripheral motor nerve regeneration. *Biomaterials* 2012; 33(35): 9027-36.