

骨髓间充质干细胞

临床研究进展

主 编 王 彤

副主编 吴燕峰

骨髓间充质干细胞

临床研究进展

王 强 王 强
邵文强 邵文强

人民卫生出版社

骨髓间充质干细胞

临床研究进展

主 编 王 彤

副主编 吴燕峰

编 委 (按姓氏笔画排序)

万 智 (四川大学华西医院)

王 彤 (中山大学附属第二医院)

王景峰 (中山大学附属第二医院)

吕菁君 (武汉大学人民医院)

吴燕峰 (中山大学附属第二医院)

沈 君 (中山大学附属第二医院)

陈其奎 (中山大学附属第二医院)

黄 科 (中山大学附属第二医院)

黄 辉 (中山大学附属第二医院)

符 岳 (中山大学附属第二医院)

蓝育青 (中山大学附属第二医院)

编 者 (按姓氏笔画排序)

于 涛 (中山大学附属第二医院)

王 朗 (武汉大学人民医院)

王 鹏 (中山大学附属第二医院)

叶记超 (中山大学附属第二医院)

任 萌 (中山大学附属第二医院)

任明亮 (中山大学附属第二医院)

刘春霞 (中山大学附属第二医院)

李世渊 (中山大学附属第二医院)

孟晓彦 (四川大学华西医院)

翁胤仑 (中山大学附属第二医院)

曾 彬 (武汉大学人民医院)

谢双伦 (中山大学附属第二医院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

骨髓间充质干细胞临床研究进展/王彤主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010.1

ISBN 978-7-117-12351-8

I. 骨… II. 王… III. 骨髓细胞: 干细胞—移植术
(医学) IV. R550.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 209252 号

门户网: www.pmph.com

出版物查询、网上书店

卫人网: www.ipmph.com

护士、医师、药师、中
医
师、卫生资格考试培训

骨髓间充质干细胞临床研究进展

主 编: 王 彤

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 18.5 插页: 4

字 数: 450 千字

版 次: 2010 年 1 月第 1 版 2010 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-12351-8/R·12352

定 价: 42.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)



主编简介

王彤 中山大学附属第二医院南院支部书记,急诊科副主任,留美医学博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师。2005~2007 年在美国南加州大学危重症研究院从事干细胞研究。近年来进行了一系列干细胞研究,包括骨髓间充质干细胞及心肌干细胞的分离、培养、体外扩增、鉴定、标记、注射以及在动物模型中的应用等。2007 年 11 月与干细胞研究相关的论文被美国心脏学会邀请在 2007 年佛罗里达州年会上宣读,并获得本次年会颁发的最佳论文奖。2008 年度被评为广东省南粤优秀博士研究生。近年来主持广东省自然科学基金项目 2 项,参加包括国家级课题在内的研究近 10 项。在国内外发表论文 100 多篇,其中第一作者 SCI 全文论文 5 篇(其 SCI 论文影响因子累积超过 30 分)。参编著作 6 本。参与国际顶级医学会议并在会上宣读研究论文共 3 次。目前是高等学校博士学科点专项科研基金和广东省自然科学基金评审专家,是《解放军医学杂志》和《中国组织工程研究与临床康复》杂志的编委,也是美国心脏学会及美国危重病学会委员。

序 一

干细胞研究日新月异,进展很快,成为一门新兴的学科和一种新型的治疗方法指日可待。胚胎干细胞作为一种最有希望的全能细胞,本应成为疾病治疗的利器,但对于其伦理学的争论,各国到现在还未有停止的迹象。而在各种成体干细胞中,骨髓间充质干细胞(MSCs)的研究最为成熟,最有希望作为第一个干细胞产品造福于人类。

本书主编王彤副教授,作为中美联合培养的博士生成为我的学生,在我所在的美国危重症研究所(Weil Institute of Critical Care Medicine)进行了两年的干细胞研究,主要是进行骨髓间充质干细胞方面的研究。经过两年艰苦的努力,在 MSCs 研究领域取得了瞩目的成绩,发表了至少 5 篇影响因子均在 5.0 以上的 SCI 论文。

王彤副教授回国以后,继续从事 MSCs 的系列研究,且在工作、研究之余,组织国内专家学者编写了关于 MSCs 的专著,对 MSCs 的历史和研究现状进行了深入阐述,其勤奋上进的精神可嘉。本书的顺利出版将是对干细胞研究领域非常有益的补充,将为国内干细胞研究推波助澜,锦上添花。

故乐而作序。

美国 Weil 危重症研究所所长、教授、首席科学家
中山大学客座教授

2009 年 12 月于上海

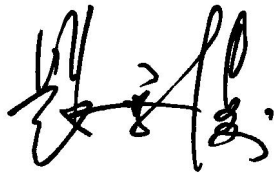
序 二

干细胞的研究和临床应用,为心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病等许多难治性疾病带来了曙光。骨髓造血干细胞的研究和应用,挽救了无数白血病患者的生命,也为干细胞的研究带来了第一个诺贝尔奖。

近年来,骨髓中存在的另一类干细胞——间充质干细胞(MSCs)的研究正在不断深入,新理论、新技术、新应用不断涌现,为干细胞的研究和应用开辟了一个新的领域。一系列的研究已经证明,骨髓来源的 MSCs 具有十分强大的增殖能力和多向分化潜能,可以在特定的诱导条件下向多个胚层的细胞分化,如心肌细胞、神经细胞、骨及软骨细胞、脂肪细胞、肝细胞等。同时, MSCs 还被证明具有十分重要的免疫调节功能和旁分泌功能。目前已经有大量关于 MSCs 的文献报道,涉及几乎所有难治性疾病的研究和临床应用。因此,我们有理由相信, MSCs 将有可能成为第一个非造血干细胞治疗技术和产品应用于临床,造福人类,并为其他干细胞的临床应用提供重要的指导意义和参考价值。

留美博士王彤副教授在积累了大量关于 MSCs 研究经验的基础上,组织多位留美博士及国内从事干细胞研究的专家学者编撰此书。从 MSCs 的起源、生物学特性、免疫学特性、体外诱导分化及 MSCs 的相关实验技术,到 MSCs 在各种疾病发生发展中的作用,以及临床治疗的基础及应用研究进行了详尽的阐述。本书的出版将为 MSCs 的深入探索推波助澜,为 MSCs 研究的从业人员开拓眼界、指点迷津,并将推动我国 MSCs 基础研究和临床应用不断向前发展。本书,值得一读。

军事医学科学院输血医学研究所 所长、教授
国家 863 计划“干细胞与组织工程”重大项目总体专家组组长



2009 年 12 月于北京

前 言

21 世纪将是各类干细胞基础研究及临床探索的“盛世”。干细胞的临床应用价值将远远超出人们目前的想象力。干细胞在各种诱导条件下向各种不同的组织器官分化,已被许多研究所证实。实验研究表明干细胞可以治疗急性心肌梗死,骨、软骨、中枢神经或周围神经损伤,消化道及肝、胰腺疾病,帕金森病,皮肤疾病,自身免疫病等多种疾病。

成体干细胞存在于成体组织器官中,与胚胎干细胞相比,有更广阔的临床应用前景。首先,成体干细胞来源于成熟器官,甚至可以从患者自身体内获得,其取材和临床应用不存在伦理道德方面的争议。其二,由于成体干细胞体外培养成功率高,细胞扩增能力强,多次传代后基因稳定性好,能在短期内获得高产量的干细胞,以满足干细胞组织工程的需要。其三,成体干细胞具有多向分化潜能,在特定的诱导条件及合适的体内生长微环境中,可定向分化为不同组织细胞系,为各种器官系统疾病的替代治疗带来了曙光。因而成体干细胞在临床研究方面所取得的进展可以用日新月异来形容。

在各种成体干细胞中,研究的最早、也最有成效的就是骨髓间充质干细胞(bone marrow MSCs)了。自从 1999 年 Pittenger MF 在 *Science* 上发表文章,奠定 MSCs 的研究地位以来,关于 MSCs 的基础理论研究及临床实验研究层出不穷,正是由于这些研究所取得的可喜成绩,MSCs 被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为第一个干细胞药物试用于临床,我国国家食品药品监督管理局(SFDA)亦于 2006 年批准 MSCs 进入 II 期临床研究。在 2006 年 4 月,细胞产品国家工程研究中心所属的间充质干细胞库在天津落成。MSCs 可望成为第一个干细胞药物正式批准用于临床治疗。

本书就是在这样的背景下产生的。希望读者通过阅读本书,能全面系统地了解 MSCs 的相关知识。也希望本书对正在或即将进行 MSCs 研究的科学工作者有所裨益。为方便读者理解和阅读,除非文中特别标注,本书中的 MSCs 均指骨髓来源的 MSCs。

编撰过程中,作者业已广览博阅、查证求实,反复推敲、字斟句酌,但由于时间紧迫,难免有偏颇之处。还望读者悉心指正。

编 者

2009 年 12 月

目 录

第一章 骨髓间充质干细胞的研究基础.....	1
第一节 骨髓间充质干细胞概述.....	1
一、干细胞的定义和特点	1
二、骨髓间充质干细胞的发展历史	1
三、骨髓间充质干细胞的基本属性与研究的优点	2
四、骨髓间充质干细胞的发展现状与前沿	3
第二节 骨髓间充质干细胞的生物学特性.....	3
一、骨髓间充质干细胞的来源与分布情况	3
二、骨髓间充质干细胞的形态特征与超微结构	3
三、骨髓间充质干细胞的细胞周期分析	6
四、骨髓间充质干细胞的增殖能力与多向分化潜能	6
五、骨髓间充质干细胞的细胞表面标志	7
六、骨髓间充质干细胞的分离纯化	9
七、骨髓间充质干细胞的体外培养	11
八、骨髓间充质干细胞的离子通道电流特性及基因特性	12
九、骨髓间充质干细胞的归巢特性	12
第三节 骨髓间充质干细胞生长的影响因素及可塑性	13
一、可塑性的定义以及骨髓间充质干细胞生长影响因素	13
二、可塑性的质疑	14
第四节 骨髓间充质干细胞的体外诱导分化	15
一、骨髓间充质干细胞的体外诱导分化必要条件	15
二、骨髓间充质干细胞的诱导方向	15
第五节 骨髓间充质干细胞的免疫学特性	17
一、骨髓间充质干细胞与造血系统细胞相互作用	18
二、骨髓间充质干细胞与淋巴系统	18
第二章 骨髓间充质干细胞移植的时机与途径	24
一、骨髓间充质干细胞在治疗心血管系统疾病的移植时机与途径	24
二、骨髓间充质干细胞在治疗神经系统疾病时的移植时机与途径	27
三、骨髓间充质干细胞在治疗运动系统疾病时的移植时机与途径	28
四、骨髓间充质干细胞在治疗消化系统疾病时的移植时机与途径	30
五、骨髓间充质干细胞在治疗泌尿生殖系统疾病时的移植时机与途径	31

六、骨髓间充质干细胞在治疗五官疾病时的移植时机与途径	32
七、骨髓间充质干细胞在治疗其他疾病时的移植时机与途径	33
第三章 骨髓间充质干细胞的标记及活体示踪技术	39
第一节 传统的组织病理学方法	39
第二节 分子影像学方法	40
一、核医学成像法	42
二、磁共振成像法	44
三、光学成像法	55
四、展望	56
第四章 骨髓间充质干细胞与心血管疾病	60
第一节 骨髓间充质干细胞在急性心肌梗死中的研究及应用	60
一、心肌梗死研究现状	60
二、骨髓间充质干细胞移植治疗急性心肌梗死	61
三、骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死的安全性系统评价	64
第二节 骨髓间充质干细胞在慢性心力衰竭中的研究及应用	67
一、骨髓间充质干细胞移植改善心功能的机制	68
二、骨髓间充质干细胞移植治疗心力衰竭的临床研究	74
三、骨髓非造血干细胞细胞动员和归巢的机制研究	77
四、骨髓间充质干细胞联合基因治疗心力衰竭	79
五、骨髓间充质干细胞治疗心力衰竭潜在的不良反应	80
第三节 骨髓间充质干细胞在心肌病中的研究及应用	84
一、骨髓间充质干细胞与扩张型心肌病	85
二、骨髓间充质干细胞与缺血性心肌病	87
三、骨髓间充质干细胞与其他类型心肌病	88
四、骨髓干细胞移植治疗心肌病的机制	89
第四节 骨髓间充质干细胞与心律失常	92
一、骨髓间充质干细胞移植治疗心律失常	92
二、骨髓间充质干细胞移植潜在的致心律失常作用	97
第五章 骨髓间充质干细胞与神经系统疾病	103
第一节 骨髓间充质干细胞在缺血性脑病中的研究及应用	103
一、骨髓间充质干细胞在缺血性脑病干细胞移植治疗研究中的优势	103
二、骨髓间充质干细胞在缺血性脑病干细胞移植治疗中的应用前景	104
三、骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑病的实验与临床研究	105
四、骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑病亟待解决的问题	108
第二节 骨髓间充质干细胞在脊髓损伤中的研究及应用	110
一、脊髓损伤的概况和病理生理机制	110
二、脊髓损伤治疗的现状和进展	110
三、骨髓间充质干细胞在脊髓损伤中的研究进展	113

第三节 骨髓间充质干细胞在神经退行性疾病的研究及应用·····	118
一、骨髓间充质干细胞与阿尔茨海默病·····	119
二、骨髓间充质干细胞与帕金森病·····	120
三、骨髓间充质干细胞与亨廷顿舞蹈病·····	121
四、骨髓间充质干细胞与肌萎缩性侧索硬化·····	122
五、骨髓间充质干细胞移植在神经退行性疾病治疗中的前景·····	123
第六章 骨髓间充质干细胞与运动系统疾病·····	126
第一节 骨髓间充质干细胞在骨修复中的研究及应用·····	126
一、骨损伤的概况及骨修复的病理生理过程·····	126
二、骨损伤的治疗现状和进展·····	126
三、骨髓间充质干细胞在修复骨损伤和骨缺损中的研究进展·····	127
第二节 骨髓间充质干细胞在软骨修复中的研究及应用·····	131
一、骨髓间充质干细胞在软骨修复中的基础研究与应用·····	131
二、骨髓间充质干细胞在软骨修复中的临床研究与应用·····	134
第三节 骨髓间充质干细胞在遗传性肌营养不良症中的研究及应用·····	144
第四节 骨髓间充质干细胞在改善肢体血液循环中的研究及应用·····	149
第七章 骨髓间充质干细胞与消化系统疾病·····	154
第一节 骨髓间充质干细胞在肠道损伤修复中的研究及应用·····	154
一、小肠上皮损伤的修复机制·····	155
二、骨髓间充质干细胞移植修复肠道损伤的研究现状·····	156
三、骨髓间充质干细胞促进肠道损伤修复的机制·····	158
四、骨髓间充质干细胞移植治疗肠道损伤的展望·····	160
第二节 骨髓间充质干细胞在其他消化系统疾病中的研究及应用·····	163
一、骨髓间充质干细胞在肝脏疾病中的研究和应用·····	163
二、骨髓间充质干细胞在胰腺疾病中的研究和应用·····	165
第八章 骨髓间充质干细胞与自身免疫性疾病·····	168
一、自身免疫性疾病概述·····	168
二、骨髓间充质干细胞移植治疗自身免疫性疾病的理论基础·····	171
三、自体骨髓干细胞移植治疗自身免疫性疾病的适应证和基本过程·····	175
四、影响骨髓间充质干细胞移植效果的因素分析·····	177
五、骨髓间充质干细胞在自身免疫性疾病中的应用·····	179
六、骨髓间充质干细胞移植治疗自身免疫性疾病的发展前景以及面临的 问题·····	185
第九章 骨髓间充质干细胞与血液系统疾病·····	191
一、间充质干细胞与造血相关的生物学特性·····	191
二、骨髓间充质干细胞在造血干细胞移植中的临床应用·····	195
三、基因治疗载体·····	197

目 录

第十章 骨髓间充质干细胞与糖尿病	201
一、糖尿病治疗现状	201
二、干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究进展	201
三、骨髓间充质干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞	203
四、骨髓间充质干细胞自体移植治疗糖尿病	206
五、自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病外周血管病变和缺血性糖尿病足	206
六、骨髓间充质干细胞联合胰岛细胞移植治疗 1 型糖尿病	209
七、目前存在的问题及研究方向	211
第十一章 骨髓间充质干细胞与泌尿系统疾病	214
一、肾源性干细胞	214
二、骨髓间充质干细胞在肾修复中所扮演的角色	220
三、骨髓间充质干细胞的基础研究和临床应用	230
第十二章 骨髓间充质干细胞与眼科疾病	240
一、眼科研究中骨髓间充质干细胞的分离和培养	240
二、骨髓间充质干细胞的生物学特性及与眼科的关系	241
三、骨髓间充质干细胞在眼科领域的应用	244
四、骨髓间充质干细胞的眼科应用前景	248
五、展望	249
第十三章 骨髓间充质干细胞与整形美容	253
一、创面及损伤修复	253
二、组织工程	255
三、成脂诱导和缺损修复	256
四、皮肤光老化与骨髓间充质干细胞移植	257
第十四章 骨髓间充质干细胞的相关实验技术	261
一、骨髓间充质干细胞的培养	261
二、骨髓间充质干细胞的纯化	264
三、骨髓间充质干细胞的鉴定	265
四、骨髓间充质干细胞的保存和复苏	266
五、骨髓间充质干细胞的基因载体技术	267
六、骨髓间充质干细胞的分化诱导技术	269
英文缩略语对照	272
索引	280
后记	287

第一章

骨髓间充质干细胞的研究基础

髓内可能存在非造血功能的干细胞。1869年Goujon证实骨髓具有成骨能力。但直到1976年,Friedenstein和Petrakova首先报道^[2],通过贴壁培养的方法分离得到MSCs,他们将兔的全骨髓组织用塑料培养皿培养,发现骨髓中存在一种能贴附于塑料培养皿,成长菱形成纤维样的细胞,4小时后弃未贴壁细胞,贴壁细胞外观呈多样性,经过2~4天的休眠期后迅速增殖,培养数代后形态趋于一致,单个细胞呈纺锤形,整体呈菊花状或同心圆状排列^[3]。新鲜骨髓内,造血干细胞所占比例较大,造血干细胞较难培养扩增,往往不贴壁生长,而间充质干细胞则易于分离扩增并贴壁生长。原代培养2~3周后,大多数造血干细胞死亡,剩下的即为MSCs。MSCs在原代培养以低密度种植可形成单细胞克隆,并增殖迅速。高密度种植生长缓慢,其原因与细胞间相互接触抑制或细胞分泌的因子作用有关。MSCs培养时呈克隆生长,能形成集落,在体外培养时能大量扩增。并推测这种细胞可能是间质细胞的前体细胞,称之为骨髓多能基质干细胞(bone marrow pluripotent stromal stem cells)。之后,一系列研究报道从骨髓中分离到的这些有黏附贴壁能力的非造血干细胞,可分化成多种成熟的间质细胞,包括成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞等。早期对这些细胞没有统一的称谓,名称可谓五花八门,这些名称包括:集落形成单位成纤维细胞^[4](colony-forming units-fibroblastic, CFU-F)、骨髓基质成纤维细胞^[5](bone marrow stromal fibroblasts)、骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells)、骨髓基质干细胞^[6](bone marrow stromal stem cells)等等。1991年Caplan把骨髓中具有黏附于塑料培养皿表面、在体外能高度扩增、并可多向分化的细胞群命名为骨髓间充质干细胞^[7]。1999年Pittenger等在*Science*杂志上发表文章,对MSCs的分离、培养、扩增和表面标记的检测进行了详细报道,并统一将骨髓间充质干细胞作为正式的命名^[8]。

Friedenstein等工作对MSCs的研究具有重要意义,进一步证实了MSCs的存在,并创建了一种体外分离和培养MSCs的简便可行的方法(贴壁分离筛选法),至今仍是一种经典的方法,得到广泛应用。自此有关MSCs的研究逐渐深入。至2001年Minguell等将MSCs概括为:存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群,它们可以在体外扩增,在体外经诱导后最终分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、肌管、神经细胞与支持造血干细胞的基质^[9]。

三、骨髓间充质干细胞的基本属性与研究的优点

从属性上看, MSCs属于成体干细胞的一种,是中胚层发育的早期细胞,是骨髓中除了造血干细胞之外的另一类干细胞,其具有干细胞的共性,即自我更新及多向分化能力,呈成纤维细胞样生长,不仅可以分化为造血基质细胞,还可以分化为许多造血以外的组织,如向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、心肌细胞、基质细胞、内皮细胞、肝和胆道上皮细胞、肺上皮细胞等中胚层细胞分化,同时又有向外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆细胞分化的潜力^[10-14]。已经有多项研究证实,把骨髓MSCs植入体内,可向多种造血以外的组织如肺、骨、软骨和皮肤等处定位并分化为相应的组织细胞。将标记的骨髓MSCs经静脉植入受体动物体内,结果在受损的肌组织中发现了有植入MSCs标记基因的肌细胞。为此有人认为MSCs可能是保留于成年组织器官中的胚胎干细胞或者MSCs具有胚胎干细胞的特征。

MSCs来自于成年的细胞,甚至可以从患者自身体内获得,而非胚胎或胎儿干细胞,因而不涉及道德及伦理学方面的问题。与其他干细胞相比, MSCs具有明显的优势。①由于MSCs很容易在体外培养,具有高度的扩增能力,在体外经多次的传代后基因稳定性依然

良好,能在短期内获得大量所需要的干细胞,故能满足干细胞治疗组织工程的需要。②具有多分化潜能,能在不同的诱导条件及合适的体内生长微环境中,定向分化为不同的组织细胞系。故具备潜在的修复各种组织和器官的能力。③能够与各种病毒载体相结合,并可进行各种基因的转染,既能保持本身基因的稳定性,还能高效的表达所转染的基因,从而在相应的损伤部位产生大量的损伤修复所需要的蛋白质。④同源性 MSCs,能通过各种不同途径输入体内,在不引起免疫排斥的同时,能在损伤部位修复受损的器官和组织。⑤可以在世界各地不同条件的实验室里繁殖和复制,且可以对所获得的 MSCs 进一步细分亚类型的细胞系,用于不同的治疗目的^[15]。正由于 MSCs 具有上述许多的优点,因而近几年来被大量应用于实验及临床的研究。美国 FDA 及中国 SFDA 均已批准 MSCs 进入 II 期临床试验^[16-18]。

四、骨髓间充质干细胞的发展现状与前沿

干细胞是近年来的研究热点,干细胞工程的深入与进展为组织工程学中的组织器官修复与代替开辟了一条新的路径。将体外分离、培养的高浓度的功能相关的活细胞种植于天然的人工合成的支架上,使之植入人体后能够形成新的有功能的组织,来制造、保存或修复失去的组织功能。其中种子细胞的体外培养扩增成为组织工程学中的重要环节。理想的种子细胞应具有容易获得、容易体外培养增殖、长期传代不改变生物学特征、抗原性小、组织修复能力强等特征。MSCs 正好具备上述条件,而被人们认为是理想的种子细胞,同时它取自自体,由它诱导分化而来的组织在进行移植时不存在免疫排斥问题等优势,使得 MSCs 在临床应用上展示了良好的前景,已经有研究揭示了它在心血管、神经系统、运动系统、消化系统、自身免疫病、血液系统、泌尿系统、眼科,骨科等系统疾病的诊断和治疗上的应用价值。对 MSCs 持续、深入的研究,在不久的将来必定能为疾病的治疗带来革命性的变革^[19-23]。

第二节 骨髓间充质干细胞的生物学特性

一、骨髓间充质干细胞的来源与分布情况

间充质干细胞是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,主要存在于全身结缔组织和器官间质中,例如成人的外周血、脂肪、皮肤、脐血、肌肉、骨骼、肌腱、脑、胎肺、胎肾、眼结膜,甚至在胎盘绒毛和羊水中也有间充质干细胞样细胞的存在,以骨髓组织中含量最多。典型的 MSCs 来源于成人的骨髓间质,而在新鲜的骨髓组织中, MSCs 含量很少,约占骨髓内单核细胞总数的 $1/10^4 \sim 1/10^5$,并随年龄的增加而减少,但是其扩增能力很强,具有易贴附于塑料培养板表面的特性,在指数生长期其倍增时间大约需要 30~33 小时,研究表明人骨髓 MSCs 可在体外传 40 代仍保持干细胞特性。本书所阐述的内容都是关于骨髓 MSCs 的特性^[24,25]。

二、骨髓间充质干细胞的形态特征与超微结构

1. MSCs 的形态学特点 骨髓间充质细胞体外培养时呈成纤维样集落形成单位,并贴壁生长,采用 Percoll(1.073g/ml)分离与培养的 MSCs 大小较为均匀,原代培养 12 小时后细胞开始贴壁,24 小时贴壁细胞可达 20%。以后贴壁细胞逐渐增多。刚贴壁的细胞通过光学显微镜观察,显示其类似成纤维细胞外观,呈圆形(可见胞浆突起)或者纺锤形,与成纤维

细胞有一定同源性的特征(图 1-1)。在高倍显微镜下观察较长时间后发现,贴壁细胞有明显的胞饮和细胞分裂活动。之后细胞逐渐增大,克隆形成,可见三角形、多角形细胞。在采用低密度接种时细胞的形态、表型和功能不均一,但能较长时间维持其分化能力。原代 MSCs 培养约 8~10 天后可传代,传代培养后的细胞体积较大,成纤维样细胞逐渐增多,同心圆状或菊花样集落形成较多,并呈放射状向周围扩展,逐渐与邻近集落相互融合。一般来说,3 天左右就会长满瓶底,需要传代,不及时传代,细胞就会老化,死亡。通过控制消化酶与消化时间的方法及优胜劣汰的原理,在不断传代过程中可分离得到纯度不断提高的 MSCs,笔者的经验是当细胞传至第三代时可获得纯度 $>95\%$ 的 MSCs(图 1-2)。

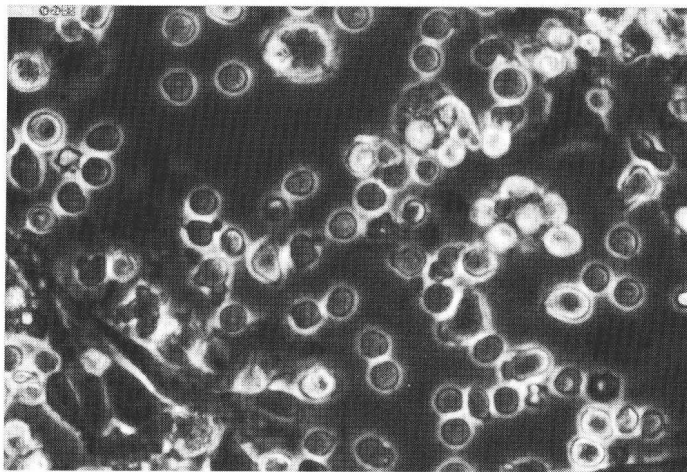


图 1-1 大鼠 MSCs 贴壁培养第三天时的细胞形态($\times 200$)

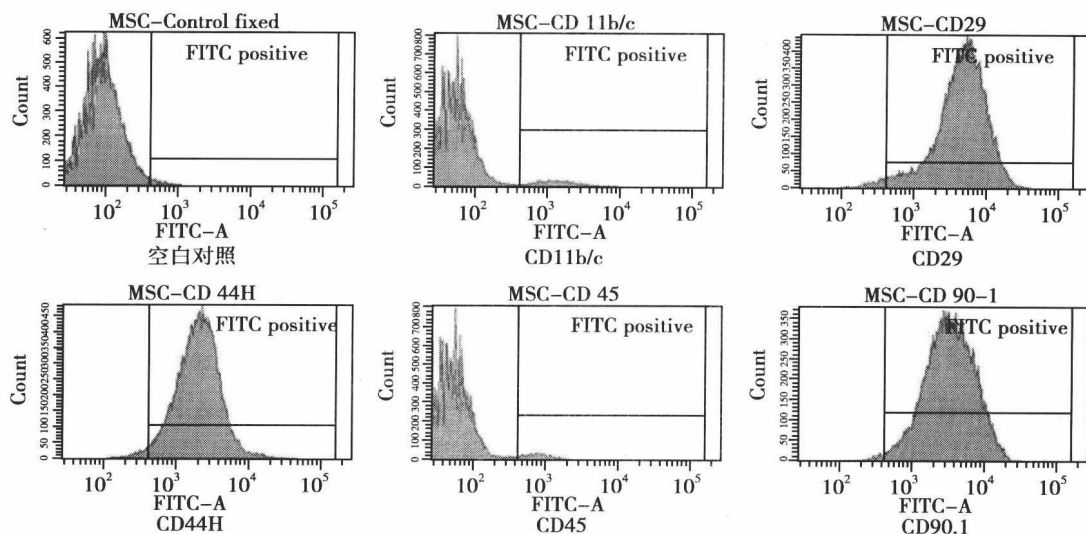


图 1-2 流式细胞仪检测结果

第三代 MSCs 表达 CD29(98%), CD44H(99.1%) 和 CD90.1(98.8%); 不表达造血干细胞的标记 CD11b/c(阳性率仅 6.5%) 和 CD45(阳性率仅 5.0%) [引自: Wang T, Tang W, Sun S, et al. Intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells improves myocardial function in a rat model of myocardial ischemia. Crit Care Med, 2007, 35(11):2587-2593.]

采用全骨髓培养法时,刚接种的细胞种类较多,4 小时后开始贴壁,6 小时内贴壁完成,刚贴壁的细胞呈圆形、纺锤形或梭形,呈现成纤维细胞外观。胞核居中,可出现 2 个或多个核。之后,贴壁细胞体积增大,克隆形成并有突起伸出,部分细胞呈三角或多角形。传代后细胞至少表现为两种形态:圆球形细胞减少,大部分为梭形或多角形。Colter 等认为形态较小的为再循环干细胞(recycling stem cells),有较强的增殖能力,可出现较高的克隆率,而形态较大的细胞为成熟骨髓间充质细胞(mature marrow stromal cells),其克隆形成率低。随着细胞传代次数增加,细胞形态、排列趋于一致^[26,27](图 1-3)。

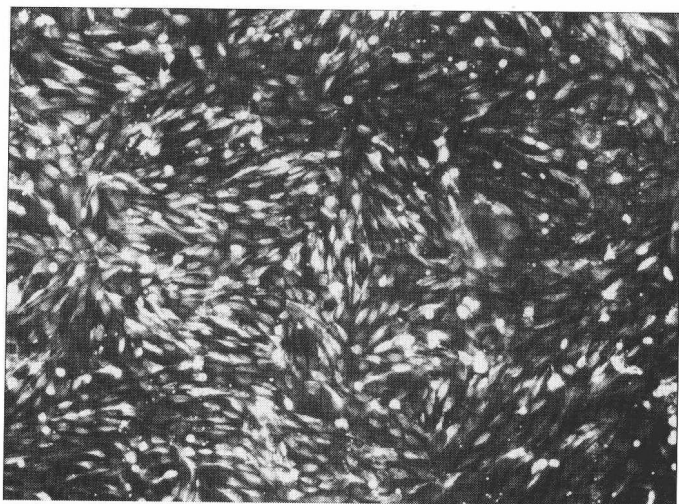


图 1-3 单个 MSCs 呈纺锤形,大量扩增后呈菊花状或同心圆状排列(文末有彩图)

[引自:Wang T, Tang W, Sun S, et al. Intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells improves myocardial function in a rat model of myocardial ischemia. Crit Care Med, 2007, 35(11):2587-2593.]

2. MSCs 的超微结构 透射电镜下人的 MSCs 细胞体积较小,核大,核形状多样,以圆形/类圆形为主,核浆比例大;染色质分布稀疏,电子密度较低;核仁大而明显,含 1 个至多个核仁不等,以 2 个核仁的细胞多见;细胞表面有微绒毛,胞浆疏松,内有丰富的核糖体,而内质网、线粒体、高尔基复合体等细胞器少见,各种细胞器不很发达提示细胞处于原始未分化状态^[28,29](图 1-4)。

SD(Sprague-Dawley)大鼠的 MSCs 在电镜下,胞浆内含有丰富的粗面内质网和线粒体。新西兰兔的 MSCs 在电镜下可见明显的染色质,细胞内有丰富的粗面内质网,线粒体、高尔基复合体发达,并有许多分泌泡。这种超微结构的差异可能与物种不同有关,是否与细胞的培养条件及观察代次不同有关尚待进一步研究。

3. MSCs 的细胞化学 将不同代次(2~15 代)的 MSCs 消化后离心涂片进行酸性萘酚醋酸酯酶(acid naphthyl acetate esterase, ANAE)、糖原反应(periodic acid schiff's reaction, PAS)及苏丹黑反应(sudan black B, SB)以及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)染色后发现,ANAE 及 PAS 强阳性,少量细胞 ALP 阳性,而 SB 及 ACP 均为阴性。