

# 组织工程骨干细胞的研究进展

许丰伟综述 柳忠豪审校

(山东省烟台市口腔医院种植中心 烟台 264001)

[摘要] 随着再生医学的迅速发展,组织工程骨为骨缺损的修复提供了一个新方法,因而成为研究的热点,而干细胞作为组织工程成骨过程中非常重要的环节,同样受到了极大的关注。干细胞的特点是具有能够在特定条件下分化为不同类型细胞的能力。本文就能够分化为成骨细胞的干细胞的分类及各自特点的相关研究进行综述。

[关键词] 组织工程骨; 干细胞; 骨缺损; 再生医学

[中图分类号] Q 254 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.034

**Research progress on engineering tissue stem cells** Xu Fengwei, Liu Zhonghao. (Dept. of Implant Center, Yantai Dental Hospital in Shandong Province, Yantai 264001, China)

[Abstract] Research in regenerative medicine is developing at a significantly quick pace. Engineering tissue bone provides a new method for bone defect, and becomes an interesting research. As very important element of engineering tissue bone, stem-cells play an important role. Stem cells are undifferentiated cells with the capability to regenerate into one or more committed cell lineages. The present review gives classification and characteristic of stem-cells differentiating into bone cells.

[Key words] engineering tissue bone; stem cell; bone defect; regenerative medicine

天然牙拔出后,拔牙创伤造成的牙槽嵴宽度在随后的 1 年内会减少约 25%,最终导致约 50%的牙槽骨丧失<sup>[1]</sup>。临床上约半数的种植体修复患者均存在不同程度的骨量不足,给种植体的植入和上部结构的修复造成困难。临床上应用的有多种骨增量技术,其中再生医学中的组织工程骨是一种新出现的发展迅速的治疗方法。拥有自我更新能力和多种细胞系分化能力的干细胞,是再生医学和组织工程学中的重要组成部分。现对多种组织工程中能够分化成骨的干细胞作一综述。

## 1 再生医学与干细胞

再生医学是通过使用创新的医疗手段重建病患或受损组织,以支持其再生的方法。采用的方法包括干细胞移植、生物人造组织(即组织工程)移植、激活局部干细胞和(或)改变局部微环境诱导受损组织再生,以及治疗性克隆等。再生医学提供了一种新颖的治疗方法,不仅控制疾病的进程,而且通过干细胞分化以及机体和功能修复的

组织工程学来提高治疗效果<sup>[2]</sup>。以细胞为基础的组织工程骨是在骨重建治疗中迅速发展的一种方法。干细胞和前体细胞的发现开启了再生医学的新篇章,它们可以替代特定的骨、软骨、肌肉、肌腱、脂肪以及各种器官的细胞和组织。

干细胞具有两个基本特性:自我更新、增殖能力以及在适当的条件下分化为不同细胞系的能力。广义来讲,主要有胚胎干细胞(embryonic cell, ESC)和非胚胎干细胞(non-embryonic cell, non-ESC)。ESC 具有全分化潜能,因此可分化为 3 种胚层细胞,non-ESC 被看作成体干细胞,具有多种分化潜能,而它们分化为不同细胞类型的潜能会受到诸多限制<sup>[3-4]</sup>。干细胞的这些特点对再生医学起到非常重要的作用。

## 2 组织工程骨的细胞资源

在不同的干细胞中,不同种群对应的再生医学的作用对象亦不同。具有成骨潜力的干细胞,包括骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)、脂肪基质干细胞(adipose tissue-derived stromal cell, ADSC)、ESC、遗传改良细胞、间充质形成层细胞、骨骼肌干细胞、脐带干

[收稿日期] 2010-11-05; [修回日期] 2012-03-06

[作者简介] 许丰伟(1985—),男,山东人,硕士

[通讯作者] 柳忠豪, Tel: 0535-6215623

细胞/前体细胞、脐带血细胞、羊膜液基质干细胞(amniotic fluid-derived stem cell, AFSC)等均可用于再生医学中的组织工程成骨。

## 2.1 骨髓基质干细胞

1867 年, Cohnheim 提出了骨髓内含有 BMSC 的观点。Friedenstein 于 1966 年发现, BMSC 是骨髓基质的组成成分, 能分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。研究<sup>[5]</sup>认为, BMSC 是中胚层的原始细胞, 可分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、肌腱细胞、骨骼肌细胞。除此, 也可以分化为外胚层器官的神经细胞和内胚层的肝细胞<sup>[6-7]</sup>。

BMSC 可以向多种间充质细胞分化, 这是一个十分复杂的过程, 涉及许多生长因子及分化机制。近年来许多学者在 BMSC 向成骨细胞分化的定向诱导方面进行了大量研究, 并取得了一定进展, 其中研究较多的主要是骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$ 、地塞米松(dexamethasone, Dex)、1,25-二羟胆骨化醇(1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, DHVD<sub>3</sub>)等诱导因素<sup>[8]</sup>。

BMP 是骨诱导活性的酸性多肽, 至今已发现 21 个亚型, 其中 BMP-2 的骨诱导活性最强。BMP 是启动 BMSC 向成骨分化的初始信号分子, 可以促使干细胞骨前体细胞分化; BMP-2 对分化早期的 BMSC 同时具有促进增殖和分化的作用, 而对分化程度较高的 BMSC 则促进分化而抑制增殖。因此认为, BMP 的效应会因细胞分化的不同程度而存在差异<sup>[9]</sup>。

TGF- $\beta$  是一种广泛存在于人体组织的生长因子, 以骨和血小板中含量最高, 可参与体内许多组织的炎症和修复反应。TGF- $\beta$  对 BMSC 的作用与细胞分化程度及密度有关, 一般早期促进增殖, 晚期促进分化, 低密度时促进增殖, 高密度时促进分化。有学者<sup>[10]</sup>证实, TGF- $\beta$  在促进成骨的同时, 还可以抑制 BMSC 向脂肪细胞的转化。

Dex 也是一种影响 BMSC 分化的因素。Cheng 等<sup>[11]</sup>认为, Dex 可促进 BMSC 分化, 但抑制其增殖, Dex 早期以促进基质合成为主, 后期则主要促进钙化。

富血小板血浆及富血小板纤维蛋白中包含的各种生长因子对 BMSC 的增殖诱导也起到了很大作用<sup>[12-13]</sup>。Kretlow 等<sup>[14]</sup>将 BMSC、纤维蛋白水凝胶及多孔支架混合植入兔颅骨缺损区, 12 周后检测到了新骨的形成。Seebach 等<sup>[15]</sup>利用内皮祖细胞、

BMSC 与  $\beta$ -磷酸三钙颗粒混合植入小鼠骨缺损处, 检测到骨完全愈合。

对于 BMSC 的取材一般采用骨髓穿刺法, 方便操作, 创伤小, 可反复取材而不影响细胞活力及机体功能。分离 BMSC 的方法主要有 3 种: 贴壁筛选法、密度梯度离心法和流式细胞分选术。

BMSC 具有广泛的临床应用前景, 国内外对患者自体 BMSC 的基础与临床研究主要集中于细胞体外培养扩增再植入体内方面, 但是存在着患者等待治疗时间长、所需费用昂贵以及伦理学争议等诸多问题, 限制了其临床应用与推广。目前, 应用患者自体 BMSC 通过浓集技术与 BMP、自体骨及多孔生物陶瓷材料复合后, 植于体内使其成骨治疗骨缺损, 是研究的热点。

## 2.2 脂肪基质干细胞

脂肪同骨髓一样起源于中胚层, 人类脂肪能够成为很好的多能干细胞的来源, 分离出的 ADSC 类似成纤维细胞样形态, 与 BMSC 类似, 并且展示出分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞和其他细胞谱系的能力<sup>[16]</sup>。

ADSC 向成骨方向诱导分化已得到证实。张迅轶等<sup>[17]</sup>观察发现, 在含 10% 胎牛血清的达尔贝科极限必需培养液中加入维生素 C、 $\beta$ -磷酸甘油、Dex 和 DHVD<sub>3</sub>, 可以促使 ADSC 分化为成骨细胞样细胞。Lee 等<sup>[18]</sup>在试管内用聚乳酸-乙醇酸共聚物(polylactic-co-glycolic acid, PLGA)负载 ADSC 进行培养, 发现其可分化为成骨细胞。Galois 等<sup>[19]</sup>在研究进行性骨发育不良病症时, 从患者皮下脂肪组织中发现异位成骨现象, 从而提出脂肪前体细胞可以向成骨细胞分化的观点。Wang 等<sup>[20]</sup>研究证实, 阿伦膦酸盐也具有诱导分化 ADSC 成骨的能力。

ADSC 与 BMSC 在骨再生以及体内骨缺损修复方面有着相同能力。Kwan 等<sup>[21]</sup>将携带 ADSC 的 PLGA 植入成年鼠 4 mm 颅盖骨缺损处, 影像学分析显示, 4 周时植入 ADSC 的老鼠的骨再生要明显好于植入成骨细胞的老鼠。

尽管骨髓是可靠的干细胞来源, 但其采集具有侵袭性且分离细胞的数量少、对年龄有所依赖。Zuk 等<sup>[22]</sup>认为, 由骨髓分离出单核细胞的 0.01%~0.001% 才可形成一个集落单位。然而, 脂肪组织却能够收集大量干细胞<sup>[23]</sup>。最初, 人类脂肪组织碎片以手工收集, 随着吸脂术的发展, 这一过程被简化, 可以通过针吸组织活检或抽脂术抽得

到,样本保存在室温下24 h内备用。ADSC为再生医学及组织工程骨的研究提供了更好的前景。

### 2.3 胚胎干细胞

ESC是从着床前胚胎(孕3~5 d)的内细胞团之中分离所得,在体外培养的一种高度未分化的细胞<sup>[24]</sup>。ESC系最早建立于1981年,Evans等<sup>[25]</sup>成功地分离和体外培养了小鼠ESC。1998年,Thomson等<sup>[26]</sup>从捐献的体外人胚中分离出了ESC,建立了人ESC系。

早期ESC的基本特征包括:1)可从胚胎细胞中分离获得;2)可长期保持未分化增殖状态;3)增殖培养后仍可诱导分化出内、中、外胚层的所有细胞系<sup>[27]</sup>。因此可在体外进行培养扩增和遗传操作,在适当条件下可诱导分化为多种组织细胞,为组织工程、细胞移植、基因治疗等开创丰富的细胞资源。有学者报道,在试管和体外实验均能显示ESC向成骨细胞分化的能力。但ESC向成骨细胞转化的研究,还处于起步阶段。

ESC尽管具有巨大的分化能力和用于再生医学的潜力,但其遗传缺陷可能会导致畸胎瘤的发生,而且围绕ESC使用的伦理争论使其发展受到一定的限制。

### 2.4 产前干细胞

一些产前组织和液体,如脐带基质、羊膜液、脐静脉血、脐带血等中的细胞具有干细胞特点。

2.4.1 AFSC De Coppi等<sup>[28]</sup>从羊膜液中分离出多能干细胞,并发现这些未分化的细胞表达某些ESC的标志物。这些细胞代表了ESC和non-ESC这两种细胞的中间阶段,它们同样可以在体内形成畸胎瘤,并且有将细胞分化为内、中、外胚层功能细胞的能力;因此,AFSC可分化为脂肪细胞、成骨细胞、肌细胞、内皮细胞、神经细胞和干细胞。

2.4.2 脐带干细胞 脐带/胎盘组织可以通过两种途径提供干细胞:脐带血和脐带基质。脐带血是一种含有多能干细胞和造血干细胞的资源<sup>[29]</sup>。脐带基质也被认为是一种多能干细胞资源<sup>[30]</sup>。将其植入异体受者后,细胞表现出低的免疫原性和局部的免疫抑制功能。对于新生儿及其母亲来说,脐带干细胞的使用均无免疫反应,且鲜有脐带干细胞的伦理争论,其可成为良好的干细胞来源。

### 2.5 骨骼肌干细胞

骨骼肌干细胞是两种具有间质特点的肌干细胞种群:肌卫星细胞(satellite cell, SC)和肌基质

干细胞(muscle-derived stem cell, MDSC)。SC存在于邻近骨骼肌纤维层和基底层下面。有文献<sup>[31]</sup>报道,SC在BMP的刺激下,可以分化为成骨细胞,表达碱性磷酸酶和钙代谢调节剂。MDSC存在于骨骼肌局部的结缔组织或肌纤维周围的微血管中。在培养过程中,MDSC表达结合蛋白、肌红蛋白D、干细胞标志物高度糖基化的型跨膜糖蛋白CD34、Bcl-2蛋白<sup>[32]</sup>。有学者<sup>[33]</sup>认为,CD45-MDSC具有成骨和成软骨分化潜力。

### 2.6 其他干细胞

Wan等<sup>[34]</sup>发现,同种外周血基质干细胞也同样具有分化成骨细胞及其他细胞的多能分化潜力。还有报道<sup>[35]</sup>指出,类似基质干细胞的颞骨乳突骨膜干细胞也具有分化成骨的能力。

## 3 结语

干细胞的实验性使用和一些临床应用已经展开。BMSC在一些动物研究和临床试验中已经显示出很好的效果。ADSC是一种新型的干细胞类型,对其研究大多还处于动物实验阶段。ESC由于其具有广泛的细胞分化能力,故存在巨大的研究潜力,但因伦理问题而受到一定限制。AFSC和脐带血干细胞为人们提供了新的选择,对其的研究目前多集中在修复临床骨缺损的可行性上。

## 4 参考文献

- [1] Joos U, Kleinheinz J. Reconstruction of the severely resorbed(Class ) jaws: Routine or exception[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2000, 28(1):1-4.
- [2] El Tamer MK, Reis RL. Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(5):327-337.
- [3] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(4):169-183.
- [4] Lee EH, Hui JH. The potential of stem cells in orthopaedic surgery[J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(7):841-851.
- [5] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells[J]. Ageing Res Rev, 2006, 5(1):91-116.
- [6] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4):364-370.
- [7] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. Science, 1999, 284(5417):1168-1170.
- [8] 王宗生,潘可风.骨髓基质干细胞及其在骨组织工程中

- 的应用研究进展[J]. 口腔颌面外科杂志, 2004, 14(3) : 276-279.
- [9] Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro* [J]. J Cell Biol, 1991, 113(3) :681-687.
- [10] Locklin RM, Williamson MC, Beresford JN, et al. *In vitro* effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells[J]. Clin Orthop Relat Res, 1995(313) : 27-35.
- [11] Cheng SL, Zhang SF, Mohan S, et al. Regulation of insulin-like growth factors and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone[J]. J Cell Biochem, 1998, 71(3) :449-458.
- [12] Zhu SJ, Choi BH, Jung JH, et al. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(2) :175-179.
- [13] Liao HT, Chen CT, Chen CH, et al. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction[J]. J Trauma, 2011, 70(1) :228-237.
- [14] Kretlow JD, Spicer PP, Jansen JA, et al. Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(12) :3555-3568.
- [15] Seebach C, Henrich D, Kähling C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto  $\beta$ -TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(6) :1961-1970.
- [16] Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Biochimie, 2005, 87(1) :125-128.
- [17] 张迅轶, 仵敏娟, 刘厚奇. 人皮下脂肪来源脂肪干细胞的分离培养及鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(8) : 813-816.
- [18] Lee JH, Rhie JW, Oh DY, et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells(hASCs) in a porous three-dimensional scaffold[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(3) :456-460.
- [19] Galois L, Mainard D, Delagoutte JP.  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery [J]. Int Orthop, 2002, 26(2) :109-115.
- [20] Wang CZ, Chen SM, Chen CH, et al. The effect of the local delivery of alendronate on human adipose-derived stem cell-based bone regeneration[J]. Biomaterials, 2010, 31(33) :8674-8683.
- [21] Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, et al. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(R1) :R93-R98.
- [22] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12) :4279-4295.
- [23] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411) :143-147.
- [24] Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, et al. The new stem cell biology : Something for everyone[J]. Mol Pathol, 2003, 56(2) :86-96.
- [25] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819) :154-156.
- [26] Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells [J]. Curr Top Dev Biol, 1998, 38 :133-165.
- [27] 杨柳, 段小军. 骨组织工程学中种子细胞研究的前沿问题[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4) :532-533.
- [28] De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(1) :100-106.
- [29] Kögler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential[J]. J Exp Med, 2004, 200(2) :123-135.
- [30] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord [J]. Stem Cells, 2004, 22(7) :1330-1337.
- [31] Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, et al. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells[J]. Development, 2002, 129(12) :2987-2995.
- [32] Cao B, Huard J. Muscle-derived stem cells[J]. Cell Cycle, 2004, 3(2) :104-107.
- [33] Adachi N, Sato K, Usas A, et al. Muscle derived, cell based *ex vivo* gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects[J]. J Rheumatol, 2002, 29(9) :1920-1930.
- [34] Wan C, He Q, Li G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells(MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model[J]. J Orthop Res, 2006, 24(4) :610-618.
- [35] Ringe J, Leinhase I, Stich S, et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells : Promising candidates for skeletal tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(2/3) :136-146.

(本文编辑 张玉楠)