

· 综述 ·

脐带血间充质干细胞的研究进展

程文广 罗高兴 吴军

人脐带血是胎儿出生时脐带内及胎盘近胎儿一侧血管内的血液,富含干细胞和祖细胞,其中主要是造血干细胞和间充质干细胞(MSC)。MSC是目前备受关注、具有自我更新能力和多向分化潜能的组织干细胞,与骨髓来源的MSC相似,但来源更充足、抗原性更低,能无创获取并规避伦理学困扰。本文就脐带血MSC的研究进展及应用前景进行综述。

1 脐带血 MSC 的分离纯化及体外培养

1.1 脐带血 MSC 的分离纯化

自证实脐血中含有MSC以来^[1],人们一直致力于建立稳定简便的方法对其进行分离培养。由于破骨样细胞的存在,能否从脐血中获得均一的MSC存在较大争议^[2]。有文献报道,密度梯度离心法分离脐带血单个核细胞(MNC)后,利用MSC容易在塑料上贴壁生长的特性,将其从造血系统细胞及淋巴细胞中分离出来并稳定传代扩增^[3]。实验表明,在优化的分离和培养条件下,59例低体积脐带血标本中有63%可以培养出MSC,与成人骨髓分离的MSC相近^[4]。罗芳等^[5]报道,MSC培养成功率能达到54%。脐带血每 1×10^8 个MNC中可以形成0~2.3个MSC克隆,接种数量在 $1.25 \times 10^8/L$ 以上者培养成功率达83.3%。脐带血单位体积内MNC含量与胎龄呈负相关,小胎龄者MSC集落形成能力高于大胎龄者。

通过流式细胞仪分选表达特异标记的MSC,可以获得较好的分离效果,但实验条件要求高,所需标本量大。有学者利用单细胞克隆的方法获得MSC细胞株^[6],但不利于大量收获。Ju等^[7]报道,聚左旋赖氨酸与超顺磁性的三氧化二铁颗粒结合而成的 Fe_2O_3 -PLL可以用于标记MSC。此种方法对细胞增殖以及凋亡无显著影响,标记后的细胞悬液经标准的1.5 T核磁共振显影后,可以用来示踪并分离MSC。另有文献报道,利用MSC抵抗渗透性溶解的特性在低渗溶液中分离MSC,也能取得较好的分离

效果,不影响其增殖和多分化潜能^[8]。

1.2 脐带血 MSC 的体外培养

使用含低浓度胎牛血清(FBS)的DMEM/F12培养基或低糖培养基,能更好地促进脐带血MSC纯化,促进细胞贴壁及扩增。接种相同数目的MNC,在经FBS包被后的培养板培养较普通培养板中可以得到更多的MSC克隆^[4]。另有研究表明,人脐带血血清(CBS)可以替代FBS用于培养MSC,其形态和免疫表型相似性达96%,且集落形成数显著提高。结论认为,CBS支持MSC的生长,能显示出更高的分化潜能,可以作为有效的替代品^[9]。

2 脐带血 MSC 的表面标记物及其鉴定

MSC是混合细胞群,表面标志抗原具有非单一性,可表达间充质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志,还可以表达SH2、SH3、SH4、CD9、CD10、CD29、CD44、CD51、CD54、CD58、CD59、CD61、CD62L、CD80、CD90、CD102、CD105、CD120、CD121、CD123、CD126、CD127、CD140a、CD147、CD166,以及许多黏附分子或黏附分子受体如胞间黏附分子1(ICAM-1)、ICAM-2、淋巴细胞功能相关抗原3、白细胞选择素、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)等,但不表达造血谱系特异的表面分子如CD14、CD34、CD38、CD45等。可疑表达者有CD38、膜联蛋白V、内皮细胞选择素、表皮生长因子(EGF)受体、CD34阳性骨髓细胞单克隆抗体STRO-1等,引起分歧者有CD4、CD31、CD71、CD104、CD117、成纤维细胞生长因子1(FGF-1)受体,不同作者所报道的结果不一。Chang等^[10]报道,从脐带血中分离出的间充质祖细胞(MPC)有两种不同的形态学表现,即扁平形和纺锤形。这两种细胞除了CD90以外表现相似的表面分子标记,其中大多数纺锤形表现为 $CD90^+$ 且具有更大的分化为脂肪细胞的趋势,扁平形MPC则相反。脐带血MSC与骨髓来源的MSC一样,能够稳定表达CD29、CD44、CD105,但不表达CD34、CD45和人类白细胞DR抗原(HLA-DR)。一般认为,整合素家族成员CD29、黏附分子CD44、CD105等是其重要标志。目前没有找到MSC的特异性标记抗原,

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:吴军,Email:junwupro@126.com,电话:023-68754006

主要根据其形态和功能进行鉴定。有报道,结合上述特征再利用体外诱导 MSC 向多种细胞定向分化,可以作为准确的鉴定方法^[11]。

3 脐带血 MSC 的分化潜能

MSC 具有向多种组织细胞分化的潜能,与骨髓来源的 MSC 相比,更原始、更接近胚胎干细胞,具有更大的分化潜能。实验显示,妊娠早期血液、肝脏、骨髓中的 MSC 可表达干细胞多潜能分化标志物,如胚胎干细胞标记物 Oct-4、Rex-1,特殊期胚胎抗原 3 (SSEA-3)、SSEA-4,肿瘤排斥抗原 (Tra)-1-60 和 Tra-1-81 等,而成人 MSC 则相反^[12]。胎儿 MSC 端粒酶长度、活性都高于成人 MSC 且表达更多的人端粒酶催化亚单位基因。目前在体外能诱导 MSC 分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、神经样细胞、心肌细胞、内皮细胞。体外培养 MSC 时添加 FGF-4 或肝细胞生长因子,28 d 后大约有 63.6% 的细胞变小变圆,发生内皮细胞样形态学改变。与对照组比较,细胞培养上清液的甲胎蛋白水平从 12 d 开始显著升高,28 d 达峰值 ($P < 0.01$);白蛋白含量从 16 d 开始显著升高 ($P < 0.01$);20 d 时能检测出尿素并且持续升高至 28 d ($P < 0.01$)。通过免疫细胞化学检测可知,细胞在 16 d 开始表达肌酸激酶 18。反转录聚合酶链反应检测显示,分化后的细胞以时间依赖性表达特殊的肝细胞基因。在 24 d 时开始观测到糖原贮积。结果表明 MSC 不仅可以分化为骨细胞、脂肪细胞和神经样细胞,还可以分化为肝细胞^[13]。

Nunes 等^[14]报道,用条件培养基诱导培养脐带血干细胞或将之与人肌细胞共培养,不能促使其分化为肌管并表达抗肌萎缩蛋白。但将绿色荧光蛋白 (GFP) 标记过的脐带血造血干细胞 (HSC) 和 MSC 移植入 MDX 小鼠四头肌后,可以表达人肌原性标志物。从小鼠肌肉中重新分离这些细胞进行体外培养,能够形成 GFP 阳性的肌管并表达抗肌萎缩蛋白。结论认为,利用化学因素以及体外细胞接触等诱导方法不足以促使 HSC 向成肌细胞分化,而体内肌环境可以激活其定向分化。有报道,用血管内皮生长因子 (VEGF)、EGF 和皮质醇诱导培养 MSC,3 周后细胞开始表达多种内皮细胞表面分子标志,如 VEGF 的激酶结构域受体 Flk-1、fms 酪氨酸激酶样受体 Flt-1、血管内皮-钙黏蛋白、血管性血友病因子、VCAM-1 和血管生成素受体 Tie-1、Tie-2 等,并分泌特殊细胞因子,分化后细胞能够吸收低密度脂蛋

白并形成管型网状结构^[15]。另外,国内已有学者用 5-aza 作为诱导剂使脐带血 MSC 在体外分化成心肌细胞^[16]。

4 脐带血 MSC 应用前景

脐带血 MSC 的多向分化潜能和较弱的免疫原性,使其具有良好的研究和应用前景,在细胞替代治疗、基因治疗以及组织器官的再造中具有重要的临床应用价值。

4.1 修复神经、肌肉及骨损伤

作为组织工程的一种新型种子细胞, MSC 已被应用于肌肉、骨及软骨缺损的修补,在治疗肌肉萎缩症、神经障碍性疾病^[17]中也有令人关注的效果。Koponen 等^[18]用脐带血分离出 HSC 和 MSC,体外转染 VEGF-D/增强型 GFP (EGFP) 后移植入局部肌肉缺血模型的裸鼠体内。结果 MPC 能促进缺血肌肉的再生,尽管它们不直接参与血管再生和肌形成,但是在急性肌损伤后 MPC 间接提高了肌肉的再生能力。遗传性骨发育不良和成骨不全常引起多发性骨折。Guillot 等^[19]在成骨不全的孕小鼠子宫内移植或不移植人脐带血 MSC,结果未移植组新生小鼠 97.9% 发生骨折;移植组新生小鼠仅有 58.6% 发生骨折,且骨骼强度、厚度、长度均有所提高。移植组新生小鼠体内供体细胞主要集中于骨组织,在骨骼的生长活跃区、愈合区及重塑区成簇生长,并且表达成骨细胞谱系的相关基因,合成骨桥蛋白。结论认为,子宫内移植胎儿 MSC 可以显著减少 III 型成骨不全小鼠的骨折发生率及其骨骼异常。另有学者在动物脊索损伤部位直接注射脐带血 MSC,通过磁共振、体感诱发电位及组织病理学检查等对治疗效果进行评价。结果移植组动物的脊索修复效果及神经传导功能明显优于对照组,提示脐带血 MSC 移植可以作为治疗脊索损伤的新方法^[20]。

4.2 修复上皮组织创面

MSC 来源于中胚层,但在特定条件下,可分化为各胚层的多种细胞或组织。有文献报道, MSC 经过特殊培养及 EGF、维甲酸诱导,移植入 Scid 小鼠体内后,在小鼠气道上皮细胞中可见角蛋白和人囊性纤维化跨膜转导调节因子的少量表达^[21]。另有实验表明,体外分离培养人脐带血 MSC,用 GFP 表达载体 pEGFP 转染并标记 PKH26 示踪,通过流式细胞技术筛选出 EGFP⁺ PKH26⁺ 细胞,注入受伤的 BALB/c 裸鼠体内。2 周后在受者皮肤组织内可以检测到一定数量的 EGFP⁺ PKH26⁺ 细胞,经 sry 基

因(Y染色体性别决定区)和HLA-1检测,进一步证实脐带血MSC定位于受者小鼠皮肤组织,有角蛋白8(K8)和K10的表达^[22]。提示MSC在体内能趋化至创面并向上皮细胞分化、促进上皮的再生,成为治疗烧伤创面的细胞来源。

4.3 促进造血功能重建

脐带血MSC是为造血提供结构与功能支持的基质细胞,可以通过分泌造血生长因子调节HSC的分化。MSC与HSC联合移植,可以提高HSC的移植成活率^[23]。将MSC与脐带血中CD34⁺细胞联合植入重症免疫缺陷小鼠体内,其重建造血成功率要明显高于单独移植CD34⁺细胞。

脐带血MSC与从骨髓、脂肪、皮肤中分离出来的MSC在形态学、表面分子标志物以及分化潜能上无异,但由于含量及增殖活性较低以及在临床治疗中尚存在免疫排斥问题,限制了其广泛应用。目前,有关脐带血MSC的研究还处于起步阶段,在分离纯化、分化方向的调控及其机制方面有待进一步探讨。随着生物学技术的发展和研究的不断深入,将为脐带血MSC在临床应用提供更广阔的前景。

参考文献

- [1] Erices A, Conget P, Minguell JJ, et al. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000, 109: 235-242.
- [2] Sarah A, Wexler, Craig D, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *B J Haematol*, 2003, 121: 368-374.
- [3] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 2004, 103(5): 1669-1675.
- [4] Bieback K, Kern S, Kluter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 625-634.
- [5] 罗芳, 杨于嘉, 王霞, 等. 脐血间充质干细胞成功培养的相关因素探讨. *中华儿科杂志*, 2006, 44(7): 509-512.
- [6] Mohyeddin B, Alimoghaddam KA, Goliaei ZA, et al. Which factors can affect cord blood variables. *Transfusion*, 2004, 44(5): 690-693.
- [7] Ju S, Teng G, Zhang Y, et al. In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Magn Reson Imaging*, 2006, 24(5): 611-617.
- [8] Parekkadan B, Sethu P, Poll D, et al. Osmotic selection of human mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord blood. *Tissue Eng*, 2007, 13(10): 2465-2473.
- [9] Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 2007, 31(3): 293-298.
- [10] Chang YJ, Tseng CP, Hsu LF, et al. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int*, 2006, 30(6): 495-499.
- [11] 李启明, 程天民, 李宁, 等. 脐血间充质干细胞分离、培养与鉴定. *重庆医学*, 2005, 34(6): 879-881.
- [12] Guillot PV, Gotheerstrom C, Chan J, et al. Human first trimester fetal mesenchymal stem cells (MSC) express pluripotency markers, grow faster, and have longer telomeres compared to adult MSC. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 646-654.
- [13] Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, et al. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int*, 2006, 30(7): 569-575.
- [14] Nunes VA, Cavacana N, Canovas M, et al. Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment. *Biol Cell*, 2007, 99(4): 185-196.
- [15] Gang EJ, Jeong JA, Han S, et al. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2006, 8(3): 215-227.
- [16] 余正堂, 李庚山, 杨汉东. 体外诱导脐带血干细胞成心肌细胞的实验研究. *邵阳医学院学报*, 2002, 21(2): 65-68.
- [17] El-Badri NS, Hakki A, Saporta S, et al. Cord blood mesenchymal stem cells; potential use in neurological disorders. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(4): 497-506.
- [18] Koponen JK, Kekarainen T, Heinonen S, et al. Cord blood-derived progenitor cells enhance muscle rregeneration in mouse hindlimb ischemia model. *Mol Ther*, 2007, 15(12): 2172-2177.
- [19] Guillot PV, Abass O, Bassett JH, et al. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood*, 2007, 29(10): 1182-1190.
- [20] Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, et al. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci*, 2007, 8(3): 275-282.
- [21] Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, et al. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007.
- [22] Dai Y, Li J, Li J, et al. Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Burns*, 2007, 4(33): 418-428.
- [23] Zhang Y, Chai C, Jiang XS, et al. Co-culture of umbilical cord blood CD34⁺ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 2006, 12(8): 2161-2170.

(收稿日期: 2007-05-14)

(本文编辑: 王旭)

读者 · 作者 · 编者

关于在杂志上刊载照片的说明

为保证印刷质量,凡需要发表在本刊的所有照片(包括黑白及彩色照片),请尽量提供分辨率在300像素/英寸以上的数码照片;如果是传统照片,请用信函形式邮寄至编辑部,切勿自行扫描处理,如质量差,本刊不予登载。

本刊编辑部