

间充质干细胞移植治疗骨质疏松研究进展*

艾菊青,毛浩萍

(天津中医药大学,天津 300193)

摘要:目前对抗骨质疏松药物的研究主要集中在骨吸收和骨形成失衡方面,对骨髓间充质干细胞(MSCs)数量和功能(迁移、归巢、分化)与骨质疏松相关性研究较少。MSCs是成骨细胞和脂肪细胞的同源体,因此当其数量减少或功能缺失造成成骨能力减弱,成脂能力增加,骨组织成分减少,脂肪组织增多,致使骨重建失衡,骨量丢失,骨微结构稀疏,引发骨质疏松。MSCs移植治疗可增加成骨细胞数量,增强成骨细胞功能,从而使得成骨分化能力变强,减少骨量丢失,提高骨密度,另一方面可使MSCs减少向脂肪细胞的分化,减少脂肪细胞数量,从而平衡成骨-脂肪分化,因此间充质干细胞治疗有望成为治疗骨质疏松新策略和方法。

关键词:骨质疏松;间充质干细胞;移植治疗

中图分类号:R274.6

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2018)01-0084-05

骨质疏松症(OP)是以骨量减少、骨组织微细结构退化、破坏,导致脆性和骨折危险性增加为特征的一种全身性、代谢性骨骼疾病^[1]。年龄逐步增长或女性进入绝经期,体内性激素水平的骤减、钙调节激素的分泌紊乱及微量元素的摄入不足是导致老年和绝经女性原发性OP的重要病因。随着经济的发展和医疗技术的进步,OP治疗花费亦在逐年增加。根据2009年国际骨质疏松症基金会首次在亚洲14个国家开展的骨骼健康状况和OP的综合性研究报告指出:至2020年,中国OP或低骨密度患者将达到2.866亿人次,而因骨质疏松引起的髋部骨折治疗经费将达到850亿元,至2050年患者人数则将跃升至5.333亿;治疗经费更剧增至1.8万亿元^[2]。因此世界卫生组织(WHO)将OP列为心血管疾病之后的第二位健康问题,但目前尚未完全阐明OP的发生机制。间充质干细胞(MSCs)是来源于中胚层存在于骨髓及多种组织中的多向分化的一类干细胞,可向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞及神经细胞等分化。MSCs符合干细胞所特有的自我更新和多向分化的潜能,又不具有致畸胎瘤的风险,因此MSCs刚被鉴定不久研究者就尝试利用MSCs移植

治疗多种疾病^[3-5]。多项研究证实,OP的发生与MSCs向脂肪和成骨分化失衡密切相关,因此,本文拟围绕MSCs与OP间的关系及现存有问题进行综述,旨在为MSCs移植治疗OP提供一定理论依据。

1 MSCs概述

Friedenstein等^[6]最早发现MSCs是一类存在于骨髓,具有呈纤维样贴壁非造血细胞。随后诸多深入实验表明MSCs呈克隆样单个核细胞团,具有较强的增殖能力和一定的自我更新能力并有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能。MSCs存在多种组织器官中,如骨髓、脐带血、脂肪、肺、肝及皮肤,但在不同组织中占有比例不同:占骨髓有核细胞的0.001%~0.01%^[7],在羊水中具有较高的比例为0.9%~1.5%^[8]。目前并未有公认的MSCs表面分子鉴定金标准,而依据其来源种属的不同具有相应差异,如来源于人的MSCs表面标记至少应该具有Strom-1,CD44,CD71,CD90,CD105的高表达;源于小鼠的为Sca-1,CD105,CD140a,CD44的高表达;造血和内皮则标记为阴性,如CD45,CD31,CD34,CD11b,CD79c等^[9]。并且多项研究显示来源于机体不同部位的MSCs,其表面分子表达标记也具有差异性,如来源于脂肪组织的MSCs会高表达CD45,而来源于骨髓的MSCs则高表达CD271,表明MSCs的表面分子表达具有不稳定性,这可能与MSCs异质性、体外培养时间和代数等多种原因相关,同时

*基金项目:国家自然科学基金项目(81303247)。

作者简介:艾菊青(1987-),女,博士研究生,研究方向为中医内科学。

通讯作者:毛浩萍,E-mail:haoping_mao@126.com。

也需要更多深入的研究来探索和准确的鉴定 MSCs 表面分子标记。

MSCs 作为脂肪细胞和成骨细胞的同源体,当成骨-脂肪间失衡,就能引起 OP。研究表明老化促进 MSCs 向脂肪细胞转化,可能是由于老化引起活性氧簇(ROS)增加,激活过氧化酶体增殖物激活(PPAR)受体,从而导致 MSCs 向脂肪细胞分化增多,造成成骨-脂肪的失衡^[10-11];李东菊等的研究也证实去势后大鼠 MSCs 增殖能力及成骨分化能力减弱,且趋向脂肪细胞进行分化^[12]。同时, MSCs 可分泌多种生长因子和细胞因子,利于受损组织进行修复,如 MSCs 通过分泌骨形成蛋白(BMPs)进行软骨、骨及肌腱等修复^[13]。且 MSCs 的获得不受伦理限制,也无并发畸胎瘤等风险, MSCs 具有易获得性及明确的成骨分化能力,均为日后其移植治疗骨质疏松奠定了基础。

2 MSCs 移植治疗 OP 的可行性

由于 MSCs 具有广泛的获得性并拥有多向分化的潜能,且多项研究表明 MSCs 能够在机体组织损伤、生长及愈合中进行替换和更新体内细胞。因此,被认为具有较强促再生能力的 MSCs 在治疗 OP 中具有广泛的应用前景。

2.1 单纯的 MSCs 移植治疗 OP 作为脂肪细胞和成骨细胞的同源体, MSCs 数量的减少或功能的缺损,会直接引起 OP,因此,系统或局部移植正常功能的 MSCs 被认为对治疗 OP 具有一定的疗效。

Deepshikha T 等^[14]研究去势后大鼠 MSCs 修复功能,采用流式细胞术观察去势后大鼠 MSCs 数量的变化,发现去势后大鼠 MSCs 干细胞表面分子标记 CD90 和 CD54 表达率明显下降,且去势后大鼠的 MSCs 更倾向于脂肪细胞分化;而后分别将去势后大鼠的 MSCs 及正常大鼠的 MSCs 移植至骨折大鼠,3 h 后采用双探头单光子发射计算机断层成像术(SPECT/CT)扫描,结果显示,尽管去势后大鼠的 MSCs 也具有改善钙结合能力及提高骨折区域骨量的功能,但效果明显低于正常组的 MSCs,且归巢至骨折区域去势大鼠的 MSCs 明显少于正常组的 MSCs。Jinhui S 等^[15]分别将 1~2 月龄的年轻小鼠和 20~24 月龄自然衰老老年小鼠的 BMMSC 移植至自然衰老的雌性小鼠中,6 个月后发现移植年轻小鼠 MSCs 组骨膜有更多的 MSCs,且骨钙素(OC)含量要远高于老年组,这也证实了老化后 MSCs 的增殖、归巢及成骨分化能力均要减弱,另外同时发现移植至年轻小鼠 MSCs 组的小鼠平均寿命长于老年组。

Dmitriy 等首先应用脊柱损伤大鼠,并分别采用 MSCs 移植或 PTH 注射单治疗法或联合治疗 2 周,观察脊柱伤口愈合情况,结果显示 PTH 注射可以提高 MSCs 迁移至骨折区,并促进 MSCs 向成骨细胞分化,从而促进脊柱伤口的愈合。并且为了进一步研究 MSCs 对脊柱损伤的作用情况,采用猪自分泌的 MSCs,对脊柱损伤的小猪进行了同样的 MSCs 移植治疗,结果显示移植后的 MSCs 具有减缓损伤区域的骨丢失情况,这些研究结果表明 PTH 可能是作为一种黏合剂,从而促进移植 MSCs 向损伤区域迁移,并进一步分化为成骨细胞,并阻止骨量丢失。

2.2 修饰后 MSCs 移植治疗 OP 虽然多项研究证实未经任何修饰的 MSCs 移植虽然能够驻留于骨,并具有一定增殖能力,且能够向成骨细胞分化,增加成骨细胞的数量,因此在一定程度上能够逆转骨流失,但由于宿体移植后 MSCs 归巢数量少,且驻留时长短等问题,造成 MSCs 治疗疗效存有争议,因此,研究者通过基因修饰 MSCs,期望以此提高 MSCs 治疗 OP 效果。

Yao W 等^[16]发现移植单纯 MSCs 仅能在机体停留 4~8 周,导致 MSCs 疗效效果甚微,因此,为了提高 MSCs 疗效,他们将双磷酸盐和 MSCs 表面高表达的整合素 $\alpha 4 \beta 1$ 的拟态物配体(LL2A)制成混合物后,再与 MSC 复合后同时静脉注入去势小鼠,研究结果表明相比于单纯的 MSCs 移植,LL2A-Ale 与 MSCs 复合物可通过介导细胞外基质促进 MSCs 的归巢。Sun WC 等^[17]采取逆转录病毒介导的方法将核因子 κB 活化因子(RANK-Fc)和(或)趋化因子受体 4(CXCR4)整合至 MSCs 基因组中,结果发现,静脉注射至去势后小鼠体内,过表达 RANK-Fc 和 CXCR4 的 MSCs 均可改善去势后引起的 OP,且趋化因子受体 CXCR4-MSCs 更能提高 MSCs 的归巢数量。

3 MSCs 移植治疗 OP 机制研究

3.1 MSCs 归巢作用 MSCs 的归巢是 OP 治疗重要环节,需要多种趋化因子和蛋白等参与其中,首先, MSCs 通过卷曲栓附等形式与内皮组织进行接触,接着在 G 蛋白耦合因子活化、整合素介导等激活因素下, MSCs 穿过内皮组织,从而到达基底膜完成归巢过程^[18]。

SDF1/CXCR4 被认为是影响 MSCs 归巢中最主要的信号通路,基质细胞衍生因子(SDF-1)最早被认为由干细胞分泌的可溶性配体,为 B 祖细胞生长

因子^[19],随着研究的深入,SDF-1并不同于其他炎症因子诱导的产生趋化因子,它由基质细胞持续产生,并为B淋巴细胞、骨髓髓系细胞及心血管内皮细胞等生长所必须的,而CXCR-4是目前已知的SDF-1唯一受体。源于骨髓的MSCs表达CXCR4,当受损组织如心、脑、肾、骨等具有SDF-1高表达,在AKT及P38等信号通路参与下,调控CXCR-4-MSCs迁移至受损部位^[20-22]。

3.2 MSCs分泌细胞因子作用 研究显示当局部多种炎症因子和缺氧等环境刺激,MSCs可通过自身及旁分泌多种细胞因子和生长因子促进骨组织再生和修复。Nixon AJ等发现MSCs移植至宿体后,能够分泌多种细胞因子如生长转换因子-1(TGF- β 1),胰岛素样生长因子(IGF-I和BMP2等),促进软骨、骨及肌腱等受损组织的修复^[9]。同时,外源性的MSCs进入机体后,分泌生长因子激活损伤组织周围的干细胞,因此当外源性MSCs凋亡或者不再在损伤部位驻留时,依然可以产生显著的治疗效果。不同于MSCs直接分化为成骨细胞,移植至机体的MSCs分泌多种因子,激活和启动宿主自身的再生过程发挥着更为广泛的作用。

3.3 与内皮细胞共同作用 研究发现MSCs需要与内皮组织接触后迁移至受损部位,MSCs如何与内皮组织作用机制尚未完全明确,有研究^[23]显示肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可激活内皮细胞从而提高两者的结合,并且在这过程中MSCs会分泌一系列的黏附因子,Steingen C等^[24]发现是内皮细胞的经典表型,如血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),整合素 β 1和基质金属蛋白2(MMP-2)调控,如内皮细胞表达的VCAM-1与MSCs表达的VLA-4结合后介导MSCs迁移。

4 MSCs移植治疗OP存在的问题

尽管MSCs发现较早,并进行相关研究多年,且MSCs疗法治疗多种疾病作用及机制亦得到验证,然而在追求MSCs疗效最优化且具较高安全性的同时,控制其适宜注射量、采取恰当的移植方式及达到优化疗效的途径仍是现在亟需广大研究者解决的问题。

4.1 MSCs细胞注射量及注射途径 目前,MSCs移植治疗OP还多停留于动物实验阶段,MSCs细胞治疗量暂无统一标准,研究者多采用 $1\sim 5\times 10^6$ 个/kg的细胞数^[25],且注射途径也未统一,多数研究者采用尾静脉注射的方式。因尾静脉注射会造成MSCs细

胞的丢失,并会促进MSCs向肺脏归巢,故Shuo H等^[26]采用心脏注射方式。Taketoshi K等^[27]采用局部注射方法,直接向骨折区域注射MSCs,认为可以提高MSCs的归巢数量,但也有研究认为无论是系统移植还是局部移植,MSCs细胞归巢的效率并没有差别。

4.2 MSCs体外培养时间及代数对疗效的影响 虽然MSCs存在于机体大部分组织中,但是比例却非常低,因此体外培养扩增是MSCs治疗的前期基础。而目前尚未对MSCs细胞代数作统一规定,研究显示随着MSCs体外培养时间的增加,会弱化MSCs的归巢能力。Rombouts等^[28]通过系统移植未在体外培养的EGFP-MSCs至骨髓的C57BL/6小鼠中,24h后发现55%~65%MSCs能够归巢至骨髓中,说明原代MSCs具有较高的归巢能力;研究者又分别移植了体外培养24h和48h的MSCs至骨髓的C57BL小鼠中,结果显示体外培养24h的MSCs导致MSCs归巢能力降低至10%,而将MSCs体外培养48h后,未能在骨髓等造血组织中发现MSCs,表明MSCs完全丢失了归巢能力。James DK等^[29]取新生6d小鼠骨髓中MSCs,进行体外成骨诱导培养,应用茜素红染色计算钙沉积面积比,结果显示P1 MSCs诱导的钙沉积面积比为 (46.7 ± 9.0) ,胞外钙含量为 (0.27 ± 0.06) ,而到P6时,MSCs诱导的钙沉积面积比降低至 (31.1 ± 10.1) ,胞外钙含量为 (0.2 ± 0.04) ,表明随着MSCs体外培养代数的增加,其成骨能力会逐渐减弱,但这仅局限于新生小鼠的MSCs,研究者发现6周和1a老年的小鼠MSCs并不因为代数的增加而导致成骨能力降低,这可能与MSCs异质性及体外增殖能力有关。

4.3 MSCs细胞归巢数量 尽管研究证实自体或异体MSCs系统移植均可改善OP,但多项研究表明移植后由于MSCs归巢数量有限及驻留时长问题,导致MSCs治疗OP有效率下降。Shuo H等^[26]进行系统移植MSC,运用小动物活体成像技术观察移植MSCs后不同时间点细胞归巢数量,结果发现移植1h后,MSCs基本聚集在肺脏,移植5~8d后,在骨折区仅有微弱的MSCs荧光信号,且持续1~3d后消失。RE Ploemacher课题组^[27]考察体外培养不同时间后MSCs归巢能力,结果显示随着体外培养时间的增加,MSCs归巢能力逐渐减弱。针对这些问题,研究人员也在不断的思考,尝试各种方法以试图解决这些阻碍。如对MSCs进行基因修饰,由于

CXCR4/SDF-1 轴被认为是 MSCs 归巢过程最为重要的通路,而 MSCs 表达 CXCR4 水平并不高,因此通过转染等技术使得 CXCR4 在 MSCs 中过表达,以此提高 MSCs 归巢能力。诸多研究者利用基因修饰技术进行类似实验,改造 MSCs 归巢相关的基因,如整合素 $\alpha 4$ 等,希冀提高 MSCs 归巢效率,但与此同时,也带来了免疫反应及 MSCs 增殖能力减弱等问题。

5 小结

自 2004 年以来,与 MSCs 相关的临床试验项目数量在全球范围内明显增加,表明 MSCs 治疗方案具有广泛的应用前景,虽然目前仍有许多问题亟需研究者解决,包括如何获得纯度较高的 MSCs;如何提高 MSCs 细胞归巢数量,选取合适细胞代数、细胞数量及治疗时间窗等,但在骨组织再生领域中, MSCs 移植治疗可作为新策略实现骨组织再生和修复。正如前所述, MSCs 移植后可直接增加骨内 MSCs 总数量,提高成骨分化,更为重要的是可分泌多种趋化因子,这些趋化因子对于 OP 引发的骨折具有重要的治疗意义,且 MSCs 治疗相对传统药物治疗具有治疗时间短、方式便捷等优势,因此随着研究者对 MSCs 认识的不断深入,目前未释疑问题将逐步解决,该治疗方法因其具有传统治疗方法不可比拟的优势,终将应用于 OP 的临床治疗。

参考文献:

- [1] 韩金祥. 骨分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 2010,353.
- [2] 张宝红,徐岩英,董尔丹. 2006-2013 年国家自然科学基金资助骨质疏松研究的回顾性分析[J]. 中国骨质疏松杂志 2014,20(9):1129-1132.
- [3] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276 (5309): 71-74.
- [4] Caplan AI. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9(5):641-50.
- [5] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells[J]. Cell Death Differ 2004,21(2):216-225.
- [6] Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. Cell Tissue Kinet, 1970(3):393-403.
- [7] Roemeling-van RM, Reinders ME, Franquesa M, et al. Human allogeneic bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells induce CD8+ cytotoxic T cell reactivity[J]. Stem Cell Res. 2013(3):4.
- [8] Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem

cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2007(16): 931-952.

- [9] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells[J]. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006(8): 315-317.
- [10] Almeida M, Ambrogini E, Han L, et al. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton[J]. J Biol Chem, 2009(284):27438-27448.
- [11] Stolzing A, Jones E, McGonagle D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies[J]. Mech Ageing Dev 2008, (129): 163-173.
- [12] 李东菊,葛冬霞,吴文超,等. 去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2005,36(3):318-321.
- [13] Alan JN, Laurie RG, Micheal S, et al. Gene therapy in musculoskeletal repair[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007(11117):310-327.
- [14] Deepshikha T, Mohd PK, Nitin S, et al. Ovariectomized Rats with Established Osteopenia have Diminished Mesenchymal Stem Cells in the Bone Marrow and Impaired Homing, Osteoinduction and Bone Regeneration at the Fracture Site[J]. Stem Cell Rev and Rep, 2015,(11):309-321.
- [15] Jinhui S, Yi TT, Nancy MD, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice[J]. Sci Rep, 2011,(1):67.
- [16] Yao W, Guan M, Jia J, et al. Reversing bone loss by directing mesenchymal stem cells to bone[J]. Stem Cells, 2013, 31(9):2003-2014.
- [17] Sun WC, Hyun JS, Jae YY, et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing RANK-Fc or CXCR4 Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice[J]. Molecular Therapy, 2009,17(11): 1979-1987.
- [18] Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis[J]. Science, 1996,272:60-66.
- [19] Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:14726-14729.
- [20] Ryu CH, Park SA, Kim SM, et al. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by

- stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398:105-110.
- [21] Curnock AP, Sotsios Y, Wright KL, et al. Optimal chemotactic responses of leukemic T cells to stromal cell-derived factor-1 requires the activation of both class IA and IB phosphoinositide 3-kinases[J]. *J Immunol*, 2003, 170:4021-4030.
- [22] Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, et al. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a G_i-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 1999, 163:5954-5963.
- [23] Ruster BS, Gottig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. *Blood*, 2006, 108(12):3938-3944.
- [24] Steingen C, Brenig F, Baumgartner L. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008, 44(6):1072-1084.
- [25] Jose JM, Carolina A. Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Conditions and Diseases: The Less Glittering Side of a Conspicuous Stem Cell for Basic Research[J]. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(2):193-204.
- [26] Shuo H, Liang LX, Yu XS, et al. The fate of systemically administered allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, 6:206.
- [27] Taketoshi K, Muneo I, Hiroko H, et al. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice[J]. *Blood*, 2001, 97(10):3292-3301.
- [28] Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture[J]. *Leukemia*, 2003, 17(1):160-170.
- [29] James DK, Yu QJ, Wei L, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells[J]. *BMC Cell Biology*, 2008, 9(60):1-13.

(收稿日期:2017-09-04)

The research progress about MSCs transplant of osteoporosis

AI Juqing, MAO Haoping

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Until now anti-osteoporosis drug researches mainly focus on the balance about bone resorption with formation, while little research about the relation about MSCs number and function (migration, homing, differentiation) with osteoporosis. Osteoblast and adipocyte both derived from MSCs, therefore when MSCs is impaired, which resulting that osteoblasts function decreases, and adipocyte number increases, and the bone mass losses, finally caused osteoporosis. MSCs transplant could increase bone mass and density, and it would become new methods to cure osteoporosis.

Key words: osteoporosis; MSCs; transplantation