

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.017 [http://www.crter.org]

栗扬扬, 赵庆华. 不同因子影响骨髓间充质干细胞的多向分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4299-4305.

不同因子影响骨髓间充质干细胞的多向分化

栗扬扬, 赵庆华

上海交通大学附属第一人民医院骨科, 上海市 200080

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 因骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量较低, 不同的分离方法会导致不同的分离率, 因此如何选取一种分离率高的分离方法仍有待研究。

2 文章增加的新信息: ①影响骨髓间充质干细胞向成骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素 C、维生素 D3、 β -甘油磷酸钠及乙烯雌酚等。②影响其向软骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素 C、胰岛素样生长因子及成纤维细胞生长因子等。

3 临床应用的意义: 文章内容为临床定向培养所需细胞提供了新的信息, 可以参考多种因子从而定向诱导分化所需细胞。影响其向脂肪细胞转化的主要因子有地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素和消炎痛等。但是其中一些因子的作用机制及不良反应还不明确, 需要进一步的研究与验证。

关键词:

干细胞; 干细胞学术探讨; 骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 定向诱导分化; 成骨分化; 软骨分化

摘要

背景: 在组织工程领域, 关于骨髓间充质干细胞定向诱导分化的研究越来越多, 但是细胞培养基中不同成分会对骨髓间充质干细胞的体外增殖分化产生影响。

目的: 针对培养基中不同因子对骨髓间充质干细胞定向诱导分化的作用加以综述。

方法: 第一作者应用计算机检索 1998 年 1 月至 2012 年 4 月 Pubmed 数据库及万方数据库。检索英文关键词为“bone marrow mesenchymal stromal cells, cell culture medium, differentiation”, 中文关键词为“骨髓间充质干细胞, 细胞培养, 定向诱导分化”, 纳入有关不同因子对骨髓间充质干细胞向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞定向诱导分化作用的文献, 排除重复研究。

结果与结论: 计算机初检共得到 184 篇文献, 根据纳入排除标准, 对其中 30 篇文献进行综述。大体说来, 骨髓间充质干细胞向成骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素 C、维生素 D3、 β -甘油磷酸钠及乙烯雌酚等; 向软骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素 C、胰岛素样生长因子及成纤维细胞生长因子等; 向脂肪细胞转化的主要因子有地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素和消炎痛等, 但是其中一些因子的作用机制及不良反应还不明确, 需要进一步的研究与验证。同时, 骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量较低, 不同的分离方法会导致不同的分离率, 因此如何选取一种分离率高的分离方法仍有待研究。

Different ingredients of cell culture medium influence multi-differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Li Yang-yang, Zhao Qing-hua

Department of Orthopedics, First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

栗扬扬, 女, 1992 年生, 黑龙江省桦南县人, 汉族, 2012 年上海交通大学毕业, 主要从事组织工程方面的研究。
137738780@qq.com

通讯作者: 赵庆华, 博士, 主治医师, 上海交通大学附属第一人民医院骨科, 上海市 200080
sawboneszhao@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)23-04299-07

收稿日期: 2012-08-22

修回日期: 2012-09-13

(20120602001/G-S)

Li Yang-yang, Department of Orthopedics, First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Zhao Qing-hua, M.D., Attending physician, Department of Orthopedics, First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China
sawboneszhao@163.com

Received: 2012-08-22
Accepted: 2012-09-13

Abstract

BACKGROUND: In the field of tissue engineering, there are an increasing number of studies describing oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Different ingredients of culture medium produce effects on *in vitro* proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To summarize the effects of different ingredients of cell culture medium on oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: A computer-based online retrieval of PubMed and Wanfang databases was performed to search papers published between January 1998 and April 2012 using the key words "bone marrow mesenchymal stem cells, cell culture medium, differentiation" in English and Chinese, respectively. Papers regarding effects of different ingredients of culture medium on osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells were collected. Papers with repetitive contents were excluded.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 184 papers were initially retrieved. According to inclusion and exclusion criteria, 30 of them were suitable for final analysis. Generally speaking, dexamethasone, transforming growth factor, vitamin C, vitamin D3, β -sodium glycerophosphate, and diethylstilbestrol are the main ingredients of cell culture medium to induce osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells; dexamethasone, transforming growth factor, vitamin C, insulin-like growth factor and fibroblast growth factor are the main ingredients of cell culture medium to induce chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells; dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin and indometacin are the main ingredients of cell culture medium to induce adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Nevertheless, the mechanisms of action and adverse events of some ingredients are poorly understood and need further investigation. In addition, bone marrow mesenchymal stem cells are at low level in the bone marrow and different isolation methods will lead to different cell proportions. Therefore, a method of isolating high proportion of cells should be developed.

Key Words: stem cells; stem cell academic discussion; bone marrow mesenchymal stem cells; cell culture; oriented induction and differentiation; osteogenic differentiation; chondrogenic differentiation

Li YY, Zhao QH. Different ingredients of cell culture medium influence multi-differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(23):4299-4305.

0 引言

骨髓间充质干细胞是一类非造血性的细胞, 可以从不同组织中提取分离出来。这些细胞具有体外增殖并分化成其他中胚层来源细胞的潜能。骨髓间充质干细胞缺乏造血性表面抗原, 比如CD11, CD14, CD34和CD45, 但是无骨髓间充质干细胞特异性标记分子, 由于缺乏表面抗原, 因此骨髓间充质干细胞可以在不使用免疫药物的情况下移植到同种异体内。因此, 来源广泛, 具有较高的分化再造潜能, 无特异抗原标记, 具有归巢潜能, 这些优点使得骨髓间充质干细胞具有良好的应用前景。但是细胞培养基中不同成分会对骨髓间充质干细胞的体外增殖分化产生影响, 因此文章加以综述, 着重介绍不同因子对骨髓间充质干细胞向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化的影响。

1 资料和方法

1.1 资料来源

检索人: 第一作者。

检索时间范围: 1998年1月至2012年4月。

检索数据库: PubMed 数据库、万方数据库。

英文检索词: bone marrow mesenchymal stromal cells, cell culture medium, differentiation。

中文检索词: 骨髓间充质干细胞, 细胞培养, 定向诱导分化。

检索文献量: 共计184篇相关文献。

1.2 纳入标准 ①有关不同因子对骨髓间充质干细胞向成骨分化、软骨分化和脂肪分化作用的研究。②同一领域选择近期发表的文章。

1.3 排除标准 相似和重复性研究。

1.4 对纳入文献的评价 计算机检索到129篇英文文献, 55篇中文文献。阅读标题与摘要进行筛选, 排除与此文无关的文献及重复研究。文献的类型主要包括实验研究、临床研究以及综述。共纳入30篇文献进一步分析, 其中关于骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的文献17篇^[1-17], 关于骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的文献10篇^[18-27], 关于骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化的文献3篇^[28-30]。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 如何获取足量种子细胞是骨组织工程研究的重点之一。骨髓间充质干细胞易于获取, 易于体外培养和诱导, 其成骨能力一直备受重视。通过国内外众多的实验研究, 地塞米松、转化生长因子、维生素C、维生素D3等对于骨髓间充质干细胞的成骨分化均有影响, 下面将详细介绍。

2.1.1 地塞米松 地塞米松是人工合成糖皮质激素, 可以通过增强其受体与基因组靶序列的亲合性, 从而调控受体细胞中分化基因的表达, 提高碱性磷酸酶活性, 促进其向成骨细胞转化。比如, 在大鼠类成骨细胞中, 地塞米松可以和BSP基因的启动子结合, 从而诱导BSP的转录。然而, 超过生理剂量的糖皮质激素对体内的成骨组织有毒副作用, 会抑制成骨细胞的功能。设计两种培养基进行对照实验^[1], 一组添加地塞米松, 浓度从 10^{-11} mol/L到 10^{-6} mol/L; 另一组则不添加地塞米松, 将骨髓间充质干细胞在两种培养基中培养28 d, 结果显示, 地塞米松促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的临界作用浓度为 10^{-8} mol/L, 与其生理浓度保持一致。更高浓度的地塞米松(超过 10^{-7} mol/L)则会抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化, 并导致糖皮质激素诱导的骨质疏松^[2]。高浓度的地塞米松也会抑制细胞的增殖, 并随其浓度增高抑制作用增强, 其原因主要是高浓度地塞米松会抑制胶原蛋白的合成。而当 β -甘油磷酸钠, 地塞米松, 维生素D3, 碱性成纤维细胞生长因子, 骨形成蛋白2共同作用时可促进骨髓间

充质干细胞的生长和成骨分化, 其中, 地塞米松对骨髓间充质干细胞的矿化作用是必不可少的, 当其浓度为100 nmol/L时, 可达到最大的钙化作用^[3]。

2.1.2 转化生长因子 研究表明, 适宜浓度的转化生长因子 β 1能有效促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 是目前调控骨髓间充质干细胞的首选生长因子之一, 在影响细胞生长, 细胞成骨分化、骨基质合成和骨重建中起着不可或缺的作用, 其作用受到Smad3基因的选择性调节。有学者发现, Smad3缺失不会改变转化生长因子 β 1介导的成骨细胞增殖特性, 但是细胞I型胶原和骨钙素表达均减少, 骨矿质密度降低, 骨皮质变薄, 骨小梁减少。王运涛等^[4]发现野生型Smad3基因能抑制骨髓间充质干细胞的增殖, 通过非细胞外信号调节激酶通路促进骨髓间充质干细胞向成骨分化和成熟, 说明Smad3不仅可以促进骨形成, 而且作为转化生长因子 β 1的信号转导介质而发挥作用。

骨形成蛋白属于转化生长因子 β 超家族成员, 是一种多功能的细胞生长因子。研究表明, 体外骨形成蛋白的作用可能存在种特异性, 骨形成蛋白可以促进大鼠和小鼠的成骨分化^[5-7], 但是骨形成蛋白2、骨形成蛋白4和骨形成蛋白7却不能诱导人类骨形成蛋白的成骨分化^[8-9], 骨形成蛋白2、骨形成蛋白4和骨形成蛋白7能够诱导碱性磷酸酶以及非胶原骨蛋白的形成。在促进成骨分化的骨形成蛋白家族中, 骨形成蛋白2是最主要的骨形成调控因子。但是天然的骨形成蛋白数量有限, 其生物活性难以发挥, 因此段智霞等^[10]采用了骨形成蛋白2核心功能区合成的寡肽骨形成蛋白2活性多肽, 通过体外培养第3代骨髓间充质干细胞进行实验, 结果表明, 骨形成蛋白2活性多肽在体外能诱导具有多向分化潜能的骨髓间充质干细胞向成骨方向分化, 这种诱导效应存在明显的剂量依赖关系, 最佳剂量为200 mg/L, 低于此剂量诱导效果不明显, 高于此剂量诱导效果不会出现明显增强, 不良反应却明显增加。

2.1.3 维生素C 维生素C在细胞外基质中含量丰富, 可辅助脯氨酸和赖氨酸残基的羟化, 促进基质中胶原合成, 参与调节碱性磷酸酶的活性。但是维生素在溶液中不稳定, 因此建议使用长效的维生素C衍生物, 如维生素C-2-磷酸。研究表明, 在维生素C-2-磷酸存在的情况下, 骨髓间充质干细胞内和细胞周期以

及有丝分裂相关的基因表达上调, 有利于骨髓间充质干细胞内的增殖, 然而, 缺乏维生素C-2-磷酸会导致碱性磷酸酶表达降低, 钙离子的积聚受到抑制^[11]。现在, 通常在培养基中加入 5×10^{-5} - 5×10^{-4} mol/L浓度的维生素C来诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化, 但是培养基中维生素C的浓度高达 10^{-2} mol/L的时候, 也仍然观察不到其对细胞生长的抑制作用^[12-14]。

2.1.4 维生素D3 维生素D3是一类成骨功能必需的开环甾类激素, 其活性形式为 $1, 25\text{-D}_3$, 在细胞周期中可以有效的阻碍细胞从 G_1 期向S期的转变从而抑制细胞增殖。骨髓间充质干细胞可以促进分化形成的成骨细胞分泌核因子 κB 受体活化因子配体, 减少骨保护素的合成, 从而促进破骨细胞分化成熟, 破骨细胞数量增加, 促进骨吸收^[15]。因此维生素D3可同时调节成骨细胞和破骨细胞的功能, 使骨形成和骨吸收达到一个平衡状态。张燕燕等^[16]研究表明, 设置 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} mol/L 3种浓度的 $1, 25\text{-D}_3$, 对骨髓间充质干细胞增殖的影响均表现为7 d内促进增殖, 7 d后则抑制增殖, $1, 25\text{-D}_3$ 浓度越高, 抑制作用越明显。同时, 随着测定时间延长, 3个实验组的骨保护素的测定值呈现先下降后升高, 核因子 κB 受体活化因子配体的测定值呈现先升高后下降, 其中, $1, 25\text{-D}_3$ 的浓度越高, 骨保护素的浓度越低, 而核因子 κB 受体活化因子配体浓度越高。尽管 $1, 25\text{-D}_3$ 可以和地塞米松、骨形成蛋白2协同作用促进成骨标记分子的表达, 但是当其单独作用时却不能诱导基质的矿物质化。有研究表明龟板提取物可明显促进维生素D受体的mRNA的表达, 从而诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

2.1.5 β -甘油磷酸钠 β -甘油磷酸钠可以被碱性磷酸酶水解, 是诱导骨髓间充质干细胞成骨分化过程中一种关键的无机磷酸盐。有学者发现在类骨细胞的培养基中, β -甘油磷酸钠可以诱导成骨矿物质形成, 促进乳酸的产生, 增强碱性磷酸酶的活性, 增强蛋白质和磷脂的合成, 这些表明 β -甘油磷酸钠确实可以增强成骨分化。通常, 选浓度 5×10^{-3} - 10×10^{-3} mol/L的 β -甘油磷酸钠来诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化。

2.1.6 乙烯雌酚 目前已有研究证实雌激素具有促进成骨细胞和抑制破骨细胞的作用, 有实验显示, 在体外培养兔骨髓基质干细胞, 分别用浓度 10^{-10} - 10^{-5} mol/L的乙烯雌酚干预, 并设地塞米松 10^{-8} mol/L、

β -甘油磷酸钠10 mmol/L、维生素C 50 mg/L为阳性对照。结果发现乙烯雌酚确实可以促进骨髓间充质干细胞向成骨分化, 且效果最显著的为 10^{-7} mol/L。乙烯雌酚可以通过抑制成骨细胞凋亡, 维持成骨细胞的数量来发挥骨骼系统的保护作用, 但是雌激素在人体内促进成骨分化的作用及降低雌激素的不良反应还需进一步研究。

2.1.7 人参皂苷 人参皂苷是人参的主要活性成分, 属于三萜类皂苷, 与类固醇激素具有相似的基本分子骨架, 具有相似的生物活性。根据李德绘等^[17]最近的实验结果, 人参皂苷Rb1在一定范围内(低剂量时, 如 $0.5 \mu\text{mol/L}$)对外培养的大鼠骨髓间充质干细胞具有生长促进作用, 但是在高剂量时($6.0 \mu\text{mol/L}$)对生长起抑制作用, 而对成骨分化具有促进作用。人参皂苷Rb1可以诱导成骨分化的大鼠骨髓间充质干细胞成聚集样生长, 还可促进细胞外钙盐的沉积, 并且高剂量的人参皂苷Rb1($4.0, 6.0 \mu\text{mol/L}$)比低剂量($0.5, 1.0, 2.0 \mu\text{mol/L}$)诱导形成的钙化结节面积大, 数量多。

2.2 骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化 现在通常采用细胞微团的培养方式, 并添加不同的软骨生物活性因子, 包括地塞米松、维生素C、转化生长因子 β 、骨形成蛋白、成纤维细胞生长因子和胰岛素样生长因子。其中地塞米松、维生素C和转化生长因子 β 是最有效的。

2.2.1 地塞米松 糖皮质激素功能由胞质内的糖皮质激素受体介导, 可通过诱导转录来影响分化的过程。在Buxton等^[18]的研究中, 地塞米松可以上调基因的表达, 提高软骨基质标记分子的蛋白质水平, 尤其是II型胶原的水平。然而, 与地塞米松和转化生长因子 β 的复合物相比, 单独作用的地塞米松对软骨形成标记分子, 比如聚集蛋白聚糖, 软骨寡聚基质蛋白和II型胶原等几乎没有作用。对于人体原始骨髓来源的骨髓间充质干细胞, 含有 10^{-7} mol/L地塞米松的培养基可以成功诱导骨髓间充质干细胞向软骨分化。

2.2.2 维生素C 维生素C及其衍生物维生素C-2-磷酸可以通过脯氨酸和赖氨酸残基的修正来使胶原羟化, 而向培养基中加入维生素C及其衍生物, 可以促进骨髓间充质干细胞的增殖, 同时促进胶原II型蛋白的表达, 而胶原II型蛋白是软骨基质中最重要的蛋白

质。维生素C其本身并不能使骨髓间充质干细胞发生转化,但它可以使细胞分泌的外基质有机的组成与排列,有利于细胞发挥自分泌与旁分泌作用,保证内外源因子的传输,从而具有非特异的促进细胞增殖与转化的作用,目前在培养基中采用较多的维生素C的浓度为50 mg/L^[19]。

2.2.3 转化生长因子 系列转化生长因子(转化生长因子 β 1、 β 2、 β 3)是一族具有多种功能的多肽,它能够促进细胞增殖,调节细胞分化,促进细胞合成并分泌细胞外基质。转化生长因子 β 与异源受体复合物相互作用,其中包括了两种结构相关的苏氨酸-丝氨酸激酶, I类和II类受体,并且可以通过Smad蛋白介导细胞内信号转导。Barry等^[20]研究报道,在促进葡糖胺聚糖和II型胶原聚集方面,转化生长因子 β 2和转化生长因子 β 3诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的能力强于转化生长因子 β 1,并将聚集培养的骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的过程分成3个阶段:第1阶段为诱导分化前6 d,标志为纤维调节素及软骨寡聚基质蛋白表达的上调;第2阶段为分化的第7天左右,标志为II型胶原和软骨粘连蛋白的表达,同时硫酸软骨素逐渐增多;第3阶段为随后7-14 d,糖胺多糖逐渐累积,最终形成成熟的软骨细胞。另外也有学者则提出转化生长因子 β 的任何亚型都和活化的软骨分化因子一样具有等同的效果。同时单层培养基中骨髓间充质干细胞的软骨分化依赖于转化生长因子 β 1的浓度,邓进等^[21]的实验说明不同浓度的转化生长因子 β 1对骨髓间充质干细胞具有不同的诱导效率,10 μ g/L转化生长因子 β 1可能是骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的最佳诱导浓度。

骨形态发生蛋白是转化生长因子 β 的超家族成员之一,它具有诱导骨髓间充质干细胞转化为软骨细胞的能力。骨形态发生蛋白在软骨祖细胞的测定以及诱导分化的骨形态发生的过程中都必不可少。在Richter^[22]的1项研究中,骨髓中骨髓间充质干细胞成功向软骨细胞分化,只需要添加地塞米松和转化生长因子 β ,然而对于起源于脂肪组织和滑膜组织的骨髓间充质干细胞,其分化还需要额外补充骨形态发生蛋白6。Minehara等^[23]的研究表明,骨形态发生蛋白2可以有效的促进大鼠股骨髁软骨细胞迁移至新月板,并且具有剂量依赖关系,可以将软骨细胞的迁移提高到10 μ g/L,3周之后,迁移的软骨细胞合成的外基质

可以达到3 mm厚。张清林等^[24]通过取健康Wistar大鼠骨髓,全骨髓贴壁法筛选获得骨髓间充质干细胞,体外培养传代并鉴定,结果说明转化生长因子 β 1、骨形态发生蛋白2联合作用更能促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞诱导分化,分泌软骨特异性基质。骨形态发生蛋白6在正常人的血浆中循环,由于有独特的受体及信号特征,在体内诱导动物软骨缺损再生的需要量远小于骨形态发生蛋白7^[25]。

2.2.4 胰岛素样生长因子 胰岛素样生长因子家族由2种多肽组成,即胰岛素样生长因子1和胰岛素样生长因子2。其合成受生长激素的调控,胰岛素样生长因子1和胰岛素样生长因子2生物学特征相似,但胰岛素样生长因子1作用较强。胰岛素样生长因子1是一种强有力的合成代谢刺激因子,可显著促进有丝分裂,促进软骨细胞增殖和成熟,同时也可以促进合成软骨基质蛋白多糖,延缓基质的降解并能抑制软骨细胞的凋亡,并促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。1 mg/L胰岛素样生长因子1即可良好地促进体外组织工程学软骨的形成,阻止软骨细胞凋亡,但是胰岛素样生长因子1的半衰期短,在体内环境中很快被降解,而在体外环境中功能可以保持较长时间。Huang等^[26]通过实验测定,胰岛素样生长因子1在质量浓度为5-20 μ g/L的情况下,可以有效促进骨髓间充质干细胞的增殖,具有剂量依赖性,同时上调CXCR4基因的表达,加速骨髓间充质干细胞的迁移。不过,在胰岛素样生长因子1单独存在的情况下,其对骨髓间充质干细胞的分化促进作用不明显,说明可能需要在其他因子的共同作用下,胰岛素样生长因子1才具有促进软骨分化的作用。

2.2.5 成纤维细胞生长因子 成纤维细胞生长因子普遍存在于多种器官组织中,免疫组化方法发现成纤维细胞生长因子阳性表达部位主要在细胞和细胞外基质。它能促进软骨基质,特别是II型胶原的合成,并阻止蛋白聚糖的降解。有学者用含成纤维细胞生长因子(10 μ g/L)的培养液和不含成纤维细胞生长因子的培养液培养软骨细胞,传代培养3周,发现含成纤维细胞生长因子实验组的细胞总数为无成纤维细胞生长因子实验组的2倍多,并且成纤维细胞生长因子实验组表现出良好的体内软骨形成能力。Isogai等^[27]的实验进一步表明持续释放的成纤维细胞生长因子可增强新血管形成和软骨分化,在组织工程软骨形成

中起到重大作用。成纤维细胞生长因子主要是通过旁分泌机制发挥作用,是目前发现的最强的促细胞生长因子,可以促进骨髓间充质干细胞增殖,促进软骨细胞前体的分化以及软骨细胞的增殖和分化成熟。

2.3 骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化 研究体外生成脂肪细胞不仅有利于组织器官工程,还有利于某些疾病比如肥胖症、糖尿病、再生性贫血以及缺铁性贫血等疾病发病机制的研究。因此骨髓间充质干细胞分化为脂肪组织工程研究将提供诱人的发展前景。目前常规促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化的培养基中主要含有地塞米松,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,胰岛素和消炎痛,或者这几种物质混合起来共同使用。

2.3.1 地塞米松 糖皮质激素地塞米松可以诱导转录因子C/EBP和过氧化物酶体增殖物激活受体的聚集,而转录因子C/EBP和过氧化物酶体增殖物激活受体2对于脂肪前体细胞转化为脂肪细胞至关重要。过氧化物酶体增殖物激活受体是一种成脂因子,属于核激素受体亚族,与核受体家族中大多数成员一样,活性由配体调节,在脂肪细胞前体中不表达,但在脂肪分化过程中表达并且优先于其他大多数脂肪基因的表达。曹亚伟等^[28]实验显示,地塞米松浓度为 1×10^{-7} mol/L时过氧化物酶体增殖物激活受体mRNA的表达明显高于地塞米松浓度为 1×10^{-8} mol/L组,说明地塞米松浓度为 1×10^{-7} mol/L可促进骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞。地塞米松在 10^{-8} mol/L时,成骨特异性基因表达水平升高,促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,因此说明地塞米松对骨髓间充质干细胞的分化具有双向诱导作用,并且这种作用具有剂量依赖性。

2.3.2 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤是磷酸二酯酶的特异性抑制剂,通过抑制cAMP的降解而提高胞内cAMP的水平。而cAMP是一种十分重要的脂肪诱导剂,它可通过激活cAMP反应元件结合蛋白来调控C/EBP α 和C/EBP β 表达,并进而促进脂肪细胞的产生。

2.3.3 胰岛素 胰岛素也可通过调节ERK1/ERK2信号传导途径以及降低核蛋白磷酸酶PP2A的活性来调节cAMP反应元件结合蛋白的磷酸化和转录活性。cAMP反应元件结合蛋白的激活不仅可以促进C/EBP

的表达,也能够增加过氧化物酶体增殖物激活受体2的表达。从信号传递的角度来看,激活p38信号途径、抑制p42/p44途径有助于脂肪细胞的分化^[28]。

实验表明,同时给予3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松、胰岛素和消炎痛时,可促使骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化,可能与这些细胞表达过氧化物酶体增殖物激活受体2、脂蛋白脂酶和脂肪酸结合蛋白 α P2相关。油红O为特异性的脂质结合剂,因而被用来检测脂肪细胞。焦焯亮等^[29]的实验显示,未经诱导的骨髓间充质干细胞油红O染色均为阴性,但以上4种诱导剂合用可诱导96%以上的骨髓间充质干细胞定向分化为脂肪细胞,并且所生成的脂肪细胞含有丰富的脂肪颗粒,绝大多数脂肪细胞的脂肪颗粒充满整个细胞,而单用地塞米松仅诱导6%左右的骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化。因此,建议4种试剂联合使用培养骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化。通过对照试验,在培养基中添加500 μ mol/L的维生素C-2-磷酸可以最大程度地实现脂肪的聚集^[30]。

3 讨论

骨髓间充质干细胞是具有良好应用前景的组织工程学细胞,可以诱导分化为所需的成熟细胞。大体说来,骨髓间充质干细胞向成骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素C、维生素D3、 β -甘油磷酸钠及乙烯雌酚等;向软骨分化的主要因子有地塞米松、转化生长因子、维生素C、胰岛素样生长因子及成纤维细胞生长因子等;向脂肪细胞转化的主要因子有地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素和消炎痛等,但是其中一些因子的作用机制还不明确,需要进一步的研究。某些因子,比如激素类,在人体内诱导骨髓间充质干细胞定向分化的同时是否会对人体产生不良作用,这些还有待进一步的验证。同时,骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量较低,不同的分离方法会导致不同的分离率,因此如何选取一种分离率高的分离方法仍有待研究。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计综述,分析并解析数据,所有作者共同起草,经通讯作者审校,第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Zomorodian E, Baqhaban Eslaminejad M. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration. *Stem Cells Int.* 2012;2012: 980353.
- [2] Hong D, Chen H, Xue Y, et al. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 116: 86-92.
- [3] Mostafa NZ, Fitzimmons R, Major PW, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. *Connect Tissue Res.* 2012;53(2):117-131.
- [4] 王运涛, 吴小涛, 郑启新, 等. 转化生长因子 β 1/Smad3促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究[J]. *医学研究生报*, 2007, 20(7):689-692.
- [5] Floerkemeier T, White F, Nellesen J, et al. Repetitive recombinant human bone morphogenetic protein 2 injections improve the callus microarchitecture and mechanical stiffness in a sheep model of distraction osteogenesis. *Orthop Rev (Pavia).* 2012;4(1):e13.
- [6] Lou J, Tu Y, Li S, Manske PR. Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:757-762.
- [7] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A:1544-1552.
- [8] Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, et al. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* 2003;44(Suppl. 1):305-311.
- [9] Osyczka AM, Diefenderfer DL, Bhargava G, et al. Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs.* 2004;176:109-119.
- [10] 段智霞, 郑启新, 郭晓东, 等. 骨形成蛋白2活性多肽体外定向诱导骨髓间充质干细胞向成骨方向分化的剂量依赖性研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(10):1118-1122.
- [11] Fernandes H, Mentink A, Bank RA, et al. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(5):1693-1702.
- [12] Song I, Caplan AI, Dennis JE. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *J Orthop Res.* 2009;27: 916-921.
- [13] Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, et al. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int.* 2004;28:255-265.
- [14] Pytlík R, Stehlik D, Soukup T, et al. The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30: 3415-3427.
- [15] Bersh JJ, Xu Y, Farach MC. Osteoprotegerin expression and secretion are regulated by calcium influx through the L-type voltage-sensitive calcium channel. *Endocrinology.* 2004;145: 426-436.
- [16] 张燕燕, 陈德才, 张林, 等. 不同浓度1,25-(OH)₂维生素D₃对体外培养恒河猴骨髓基质干细胞的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(2):104-107.
- [17] 李德绘, 黎洪棉, 梁自乾, 等. 人参皂苷Rb1对体外条件下大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(10):1805.
- [18] Buxton AN, Bahney CS, Yoo JU, et al. Temporal exposure to chondrogenic factors modulates human mesenchymal stem cell chondrogenesis in hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(3-4):371-380.
- [19] 李斌, 张伟, 王健, 等. 体外微团培养兔骨髓间充质干细胞形成软骨细胞[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(23):1819-1822.
- [20] Barry F, Boynton RE, Liu B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001;268(2):189-200.
- [21] 邓进, 彭吾训, 王蕾, 等. 骨髓间充质干细胞二维培养条件下向软骨细胞诱导分化的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(16): 2340-2343.
- [22] Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med.* 2009;266:390-405.
- [23] Minehara H, Urabe K, Naruse K, et al. A new technique for seeding chondrocytes onto solvent-preserved human meniscus using the chemokinetic effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Cell Tissue Bank.* 2011;12(3):199-207.
- [24] 张清林, 吕惠成, 吴一民. TGF- β 1、BMP-2联合诱导BMSCs向软骨细胞分化的体外研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(24):4371-4375.
- [25] Vukicevic S, Grgurevic L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6): 441-448.
- [26] Huang YL, Qiu RF, Mai WY, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2012;13(1):20-28.
- [27] Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, et al. Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 74(3):408-418.
- [28] 曹亚伟, 吴学建, 王义生, 等. 地塞米松对人骨髓基质干细胞成脂与成骨分化的影响的初步报告[J]. *河南外科学杂志*, 2006, 12(2): 23-25.
- [29] 焦嫦亮, 张阳德, 谢祁阳, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离及其诱导定向脂肪细胞分化[J]. *中国康复理论与实践*, 2006, 12(8): 682-684.
- [30] Choi K, Seo Y, Yoon H, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 2008;105:586-594.