

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.013 [http://www.crter.org]

许雯, 田晨, 李芳, 夏冰, 郭青, 张翼鹭. 体外扩增传代对骨髓间充质干细胞归巢相关因子的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7102-7109.

体外扩增传代对骨髓间充质干细胞归巢相关因子的影响***◆

许雯, 田晨, 李芳, 夏冰, 郭青, 张翼鹭(天津医科大学附属肿瘤医院血液科, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市 300060)

文章亮点:

1 实验构想: 提高间充质干细胞向靶向组织的特异性归巢, 是提高干细胞移植疗效的关键。间充质干细胞表面可检测到趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4, 以及趋化因子受体 CXCR6、黏附分子 CD44 等细胞因子的表达, 并已有研究显示它们在间充质干细胞的归巢过程中起重要作用。

2 技术创新: 实验采用 Ficoll 密度梯度离心法来实现健康人骨髓来源间充质干细胞的分离, 清除红细胞, 吸取中间的单个核细胞层进行贴壁培养。并依据间充质干细胞易贴附在塑料培养物上生长的特性, 将其与非贴壁细胞分离。贴壁筛选法在接种时保留造血干细胞, 然后利用间充质干细胞贴壁生长的特性将其分离纯化, 而造血干细胞在换液时被逐步清除, 从而达到纯化的目的。此类细胞同源性更强, 具有更强的自我更新能力和多向分化潜能, 被认为是比 CFU-F 更纯的间充质干细胞。

3 应用意义: 文章通过形态学以及增殖特性来分析不同代次骨髓间充质干细胞的生长特点; 并应用 Real-time PCR 法探究人骨髓间充质干细胞中 CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44 的表达是否会随细胞的体外培养传代而改变。结果显示间充质干细胞的归巢能力随扩增传代而逐渐下降, 其机制可能与 CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44 等归巢相关因子在间充质干细胞中的表达水平下降有关。

关键词:

干细胞; 干细胞因子及调控因子; 骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 归巢; CXCR4; CXCR6; CXCL12; CD44; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 细胞培养技术; 抗原, CD44; 受体, CXCR

基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81270603)*; 天津市中青年骨干创新人才培养计划资助项目*

摘要

背景: 间充质干细胞移植后在体内的归巢能力, 会随着供体细胞在体外的培养传代而下降, 从而严重影响了间充质干细胞对靶组织的修复作用。

目的: 探讨体外扩增传代对人骨髓来源间充质干细胞归巢相关因子的影响。

方法: 应用Ficoll密度梯度离心法将间充质干细胞自骨髓中分离出来, 利用其贴壁生长的特性加以纯化, 在常规培养条件下培养至第7代, 观察原代及第3, 5, 7代细胞的形态学特点。采用MTT法检测第3, 5, 7代间充质干细胞的生长增殖特性, 并绘制生长曲线。Real-time PCR法检测第3, 5, 7代间充质干细胞中归巢相关因子CXCR4、CXCR6、CXCL12(SDF-1)、CD44的表达, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各代细胞目的基因的相对表达量, 比较不同代次间充质干细胞中各细胞归巢因子表达的差异。

结果与结论: 采用密度梯度离心法自骨髓获得单个核细胞, 将其贴壁培养传至第3代, 可获得纯度较高的间充质干细胞。其在体外的增殖能力较强, 但随着传代扩增次数增加, 形态从细长梭形逐渐缩短变宽, 增殖速率、总体扩增倍数以及CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44等细胞归巢因子的表达亦随传代培养而呈下降趋势。结果显示, 间充质干细胞的归巢能力随扩增传代而逐渐下降, 其机制可能与CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44等归巢相关因子在间充质干细胞中的表达水平下降有关。

In vitro proliferation and passage of bone marrow mesenchymal stem cells impact homing-associated factors

Xu Wen, Tian Chen, Li Fang, Xia Bing, Guo Qing, Zhang Yi-zhuo (Department of Hematology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)

Abstract

BACKGROUND: The homing ability of mesenchymal stem cells after transplantation can decrease along with culture and passage *in vitro*. And the decline of homing abilities can further influence the implantation of mesenchymal stem cells in the target tissue, thus seriously affecting the repair effect.

OBJECTIVE: To investigate the effect and its related mechanisms by which *in vitro* culture and passage affect the homing ability of mesenchymal stem cells.

METHODS: Mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow using Ficoll density gradient centrifugation, and then purified using adhesion method. The mesenchymal stem cells were cultured into the

许雯★, 女, 1986年生, 天津市人, 2012年天津医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事血液肿瘤的临床与实验研究。

xuwenxuwen@hotmail.com

通讯作者: 张翼鹭, 博士, 主任医师, 天津医科大学附属肿瘤医院, 天津市 300060
aprilzyz@yahoo.com

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344 (2013)40-07102-08

收稿日期: 2013-02-26

修回日期: 2013-03-21

(201302116/G·W)

Xu Wen★, Master, Physician, Department of Hematology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China
xuwenxuwen@hotmail.com

Corresponding author: Zhang Yi-zhuo, M.D., Chief physician, Department of Hematology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China
aprilzyz@yahoo.com

Received: 2013-02-26

Accepted: 2013-03-21

seventh generations with the normal cultural condition, and the morphological features of the 3rd, 5th and 7th generations of mesenchymal stem cells were observed. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide chromatometry was used to detect the growth feature of the 3rd, 5th and 7th generations of mesenchymal stem cells, and the growth curve was drawn. Real-time PCR was used to detect the expression of CXCR4, CXCR6, CXCL12, CD44 in the 3rd, 5th and 7th generations of mesenchymal stem cells, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was calculated to get the relative value of each target gene, and the differences in expression of CXCR4, CXCR6, CXCL12, CD44 between different generations were compared.

RESULTS AND CONCLUSION: Mononuclear cells could be obtained from the bone marrow by using Ficoll density gradient centrifugation. High-purity mesenchymal stem cells could be obtained using adherent method. The ability of *in vitro* growing was strong, but following the passage, the cell morphology became wider and shorter. And the proliferation rate, the overall proliferated multiple and the expression of homing related factors decreased following the passage. The expression of CXCR4, CXCR6, CXCL12 and CD44 of mesenchymal stem cells decreased following the passage. The homing ability of mesenchymal stem cells was decreased following the passage, and may be relevant with the lower expression of CXCR4, CXCR6, CXCL12 and CD44 in cultured mesenchymal stem cells.

Subject headings: stem cells; cell culture techniques; antigens, CD44; receptors, CXCR

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81270603*; the Training Plan for Creative Middle-aged and Young Talents in Tianjin City*

Xu W, Tian C, Li F, Xia B, Guo Q, Zhang YZ. In vitro proliferation and passage of bone marrow mesenchymal stem cells impact homing-associated factors. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40):7102-7109.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是一类具有多向分化潜能的细胞,可在体外长时间保持未分化状态,增殖能力强,易于在体外大量培养,可以特异迁移到机体损伤部位及肿瘤局部,向骨组织、心肌、软骨组织、肌肉组织等分化,对心肌梗死、脑梗死^[1-2]、急慢性肝功能衰竭等具有一定的治疗作用^[3-4],显示了其强大的应用前景。

归巢一词起源于骨髓移植疗法的开展,其意义为经静脉输入的干细胞通过血液循环特定地植入到支持其生长发育的骨髓微环境中的过程。随着研究范围的扩展,目前归巢的意义已扩展为骨髓干细胞在特定条件下移行并定位于机体靶器官或靶组织的过程。当机体遭遇损伤或存在慢性炎症时,损伤部位或炎症区域会释放特殊的内分泌信号,局部表达及分泌多种趋化因子、黏附因子、生长因子,这一系列微环境改变是间充质干细胞归巢的始动因素,导致骨髓池干细胞动员至外周血,并向损伤部位迁移,损伤组织同时表达特异性受体或配体引导对应的干细胞移动并黏附于损伤处。

尽管骨髓中间充质干细胞含量相对较多,然而目前对间充质干细胞迁移归巢的研究显示靶向组织中植入间充质干细胞检出率比例较低,严重影响了间充质干细胞对靶器官组织的修复作用,难以满足细胞治疗的需要,故常需要在体外进行培养扩增才能满足需求。研究显示,间充质干细胞移植后在体内的归巢能力会随着体外培养传代次数的增加而下降^[5],因此提高间充质干细胞向靶器官特异性归巢是提高干细胞移植疗效的关键。

间充质干细胞表面可检测到趋化因子CXCL12及其

受体CXCR4,以及趋化因子受体CXCR6、黏附分子CD44等细胞因子的表达。既往研究显示CXCL12、CXCR4、CXCR6、CD44在细胞归巢过程中起到重要的作用^[6-10]。文章运用Real-time PCR法检测人骨髓来源间充质干细胞中CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44的表达,观察其表达是否会随细胞的体外培养传代而改变,初步探索间充质干细胞扩增后归巢能力下降的相关机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学水平,体外对比观察实验。

时间及地点: 于2011至2012年在天津医科大学附属肿瘤医院、天津市“肿瘤防治”重点实验室完成。

材料:

骨髓间充质干细胞体外培养扩增与归巢能力实验的主要试剂:

试剂	来源
DMEM-F12 培养液、胎牛血清	赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司
Ficoll 分离液(密度 1.077 g/mL)	北京索莱宝科技有限公司
PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa Code:DRR037)、SYBR Premix ExTaq (TaKaRa Code:DRR041)、DL2000 DNA Marker(TaKaRa Code:D501S)	大连宝生物工程有限公司
引物	生工生物工程(上海)有限公司

骨髓标本: 骨髓标本来自12名健康造血干细胞移植供者,分别为男21岁,女23岁,男25岁,女26岁,男

26岁, 男28岁, 女30岁, 男33岁, 男35岁, 男36岁, 男38岁, 男39岁。实验方案均获得供者知情同意, 并通过伦理审查。

实验方法:

间充质干细胞的分离培养: 对健康供者进行髂骨穿刺, 获得骨髓穿刺物, 标本加EDTA抗凝, 将细胞悬液置于1.077 g/mL Ficoll分离液上, 400×g离心20 min后收集单个核细胞并以200 000–400 000/cm²的浓度接种于75 cm²培养瓶中, 培养体系为含89%DMEM-F12、体积分数10%胎牛血清、1%PS的细胞培养液, 置于37 °C, 体积分数5% CO₂的培养箱中培养。72 h后去除非贴壁细胞, 每周换液1次^[11]。在常规培养条件下培养至第7代, 观察原代及第3, 5, 7代细胞的形态学特点。

绘制细胞生长曲线(MTT法): 收集第3, 5, 7代间充质干细胞对数生长期细胞, 在同一天分别均匀接种在10块96孔板中, 置于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中培养。于铺板后的24 h至第10天, 每日固定时间各取出一个96孔板, 加入MTT溶液反应, 用酶标仪检测各孔吸光度(A)值, 并绘制细胞的生长曲线。

间充质干细胞总RNA的提取并反转录合成cDNA: 收集对数生长期细胞, 加入Trizol吹打裂解, 加入氯仿1/5体系, 混匀后4 °C离心12 000 r/min, 15 min。将离心后管内上层水相置于新的无酶EP管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀后4 °C离心12 000 r/min, 10 min, 弃上清。加入体积分数75%乙醇混匀后, 4 °C离心7 500 r/min, 5 min, 弃上清。加入DEPC水溶解混匀。后采用TaKaRa公司的反转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real-time)反转录合成cDNA。

Real-time PCR法测定归巢相关因子: 采用TaKaRa公司的预混试剂SYBR Premix ExTaq(Perfect Real-time)进行反应, 并使用β-actin作为内参对照。检测第3, 5, 7代间充质干细胞中CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44的表达, 记录每个样品的目的基因和内参β-actin的Ct值, 计算相应的ΔCt以及ΔΔCt, 最后计算2^{-ΔΔCt}得到各代细胞目的基因的相对表达率, 即不同代次间充质干细胞中各细胞因子表达的差异倍数。

$$\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_a - \Delta Ct_b$$

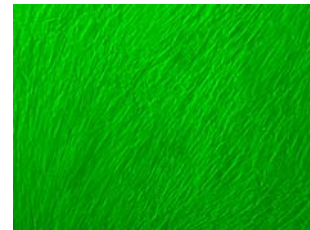
主要观察指标: 第3, 5, 7代健康骨髓来源间充质干细胞的形态学特点、细胞生长曲线及第3, 5, 7代细胞间CXCR4、CXCR6、CXCL12、CD44在基因水平表达的差异。

统计学分析: 统计学处理者为第一作者许雯, 所得实验数据用GraphPad Prism 5软件, 采用配对t检验进行统计学分析, P < 0.05被认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞分离、培养结果 间充质干细胞原代细胞呈长梭形, 细胞形态均一, 扩增速度快, 克隆形成能力强, 体外培养1至2周可传代。传代后细胞生长速度明显加快, 24 h内完全贴壁、伸展, 重新变为长梭形, 生长潜伏期较短(一两天), 培养4–7 d即达到完全融合。

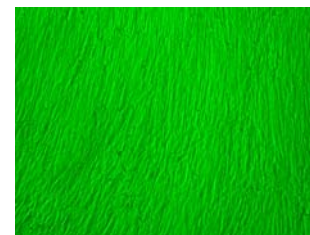
在相差显微镜下可观察到第3代与第5代健康成人骨髓来源间充质干细胞以细长梭形细胞为主, 胞浆丰富, 核大, 细胞平行或呈漩涡状盘绕排列, 贴壁培养4–7 d即可传代, 见图1, 2。



注: 相差倒置显微镜下放大100倍观察第3代健康成人骨髓间充质干细胞形态以细长梭形细胞为主, 胞浆丰富, 核大, 细胞平行或呈漩涡状盘绕排列。

图1 第3代健康成人骨髓间充质干细胞形态(第7天, ×100)

Figure 1 The morphology of the 3rd generation bone marrow mesenchymal stem cells from health adults (7 d, ×100)



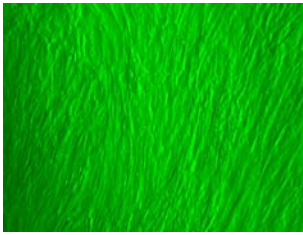
注: 相差倒置显微镜下放大100倍观察第5代健康成人骨髓间充质干细胞形态与第3代细胞相比无明显变化, 细胞以细长梭形为主, 胞浆丰富, 核大, 细胞平行或呈漩涡状盘绕排列。

图2 第5代健康成人骨髓间充质干细胞形态(第7天, ×100)

Figure 2 The morphology of the 5th generation bone marrow mesenchymal stem cells from health adults (7 d, ×100)

第7代健康成人骨髓来源间充质干细胞较前代细胞相比, 生长速度下降, 贴壁培养7–9 d可传代, 相差倒置显微镜下放大100倍, 观察细胞呈梭形, 平行或呈漩

涡状盘旋排列, 胞体较前代细胞缩短变宽, 见图3。

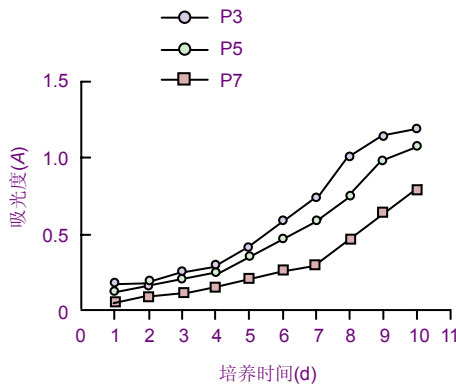


注: 相差倒置显微镜下放大 100 倍观察第 7 代健康成人骨髓间充质干细胞形态呈梭形, 平行或呈漩涡状盘旋排列, 但较第 5 代细胞胞体缩短变宽。

图3 第7代健康成人骨髓间充质干细胞形态(第7天, ×100)

Figure 3 The morphology of the 7th generation bone marrow mesenchymal stem cells from health adults (7 d, ×100)

2.2 细胞生长曲线分析(MTT法)结果 见图4。



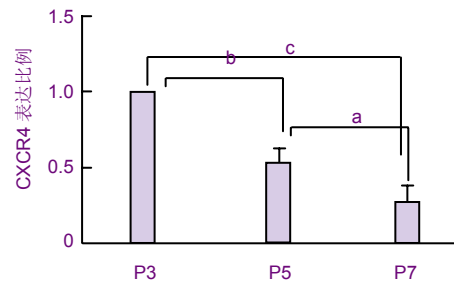
注: 随着传代次数的增加, 间充质干细胞的增殖速率及总体扩增倍数均呈现下降趋势。

图4 MTT 法绘制健康成人第 3, 5, 7 代骨髓间充质干细胞的生长曲线

Figure 4 The growth curves of the 3rd, 5th and 7th generations of bone marrow mesenchymal stem cells

如图4所示, 间充质干细胞在第3, 5, 7代的增殖速率及总体扩增倍数均随传代次数增加呈下降趋势。即第3代细胞增殖能力比第5代强, 第5代细胞增殖能力比第7代强。各代细胞均经历细胞增长的3个时期: 潜伏期, 对数生长期和停滞期。潜伏期一般为24–48 h, 对数增长期为第3–9天, 细胞数量呈对数增长。第9天左右细胞进入停滞期, 细胞不再增殖, 生长活动停滞。

2.3 CXCR4的表达 第5代间充质干细胞中CXCR4的表达量是第3代的53.18%, 第7代间充质干细胞中CXCR4的表达量是第3代的27.04%, 其间的差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图5。



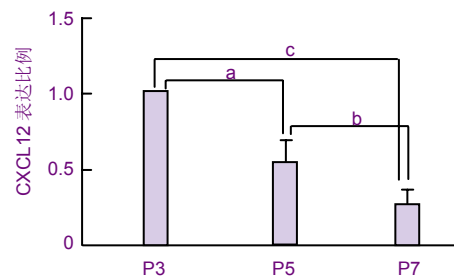
第 5 代与第 7 代比较, ^a $P < 0.05$; 第 3 代与第 5 代比较, ^b $P < 0.01$; 第 3 代与第 7 代比较, ^c $P < 0.005$ 。

注: 提示随着传代次数的增加, 间充质干细胞中 CXCR4 的表达呈现下降趋势。

图5 健康成人第 3, 5, 7 代骨髓间充质干细胞中 CXCR4 的表达变化

Figure 5 Comparison of the expression of CXCR4 in the 3rd, 5th and 7th generations of bone marrow mesenchymal stem cells from health adults

2.4 CXCL12的表达 第5代间充质干细胞中CXCL12的表达量是第3代的56.59%, 第7代间充质干细胞中CXCL12的表达量是第3代的27.41%, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。见图6。



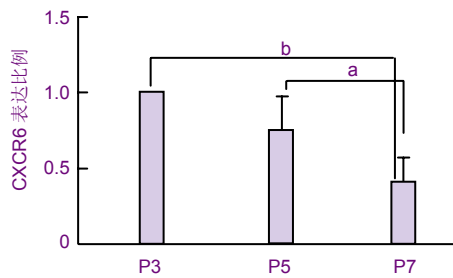
第 3 代与第 5 代比较, ^a $P < 0.05$; 第 5 代与第 7 代比较, ^b $P < 0.05$; 第 3 代与第 7 代比较, ^c $P < 0.005$ 。

注: 提示随着传代次数的增加, 间充质干细胞中 CXCL12 的表达呈现下降趋势。

图6 健康成人第 3, 5, 7 代骨髓间充质干细胞中 CXCL12 的表达变化

Figure 6 Comparison of the expression of CXCL12 in the 3rd, 5th and 7th generations of bone marrow mesenchymal stem cells from health adults

2.5 CXCR6的表达 第5代间充质干细胞中CXCR6的表达量是第3代的76.37%, 第7代间充质干细胞中CXCR6的表达量是第3代的42.12%, 且第3代与第7代, 第5代与第7代间充质干细胞中CXCR6的表达差异有显著性意义($P < 0.05$)。第5代相比第3代, CXCR6的表达有下降趋势。见图7。



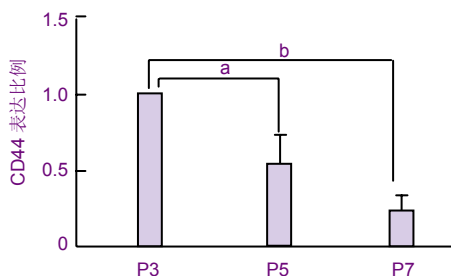
第5代与第7代比较, ^a $P < 0.05$; 第3代与第7代比较, ^b $P < 0.01$ 。

注: 随着传代次数的增加, 间充质干细胞中 CXCR6 的表达呈现下降趋势。

图7 健康成人第3, 5, 7代骨髓间充质干细胞中 CXCR6 的表达变化

Figure 7 Comparison of the expression of CXCR6 in the 3rd, 5th and 7th generations of bone marrow mesenchymal stem cells from health adults

2.6 CD44 的表达 第5代间充质干细胞中CD44的表达量是第3代的53.99%, 第7代间充质干细胞中CD44的表达量是第3代的23.56%。其中第3代与第5代, 第3代与第7代间充质干细胞中CD44的表达差异有显著性意义($P < 0.05$)。第7代与第5代相比, CD44的表达有下降趋势。见图8。



第3代与第5代比较, ^a $P < 0.05$; 第3代与第7代比较, ^b $P < 0.005$ 。

注: 提示随着传代次数的增加, 间充质干细胞中 CD44 的表达呈现下降趋势。

图8 健康成人第3, 5, 7代骨髓间充质干细胞中 CD44 的表达变化

Figure 8 Comparison of the expression of CD44 in the 3rd, 5th and 7th generations of bone marrow mesenchymal stem cells from health adults

3 讨论 Discussion

间充质干细胞是普遍存在于人体各组织中的一种成体干细胞, 从骨髓、外周血、脐血、脂肪组织、骨外膜、骨小梁、肌肉、胎肺、胎肾等组织中都可以分离出

间充质干细胞, 其中以骨髓中的含量最为丰富。

3.1 间充质干细胞分离培养方法的选择 间充质干细胞为贴壁生长细胞, 且可以聚集成均匀的细胞集落, 形成成纤维样的细胞克隆。目前主要有3种方法分离间充质干细胞: 贴壁筛选法、密度梯度离心法和免疫磁珠或流式细胞仪分选法。

贴壁筛选法: 抽取骨髓后直接加入培养液制成细胞悬液, 以合适的细胞浓度进行接种培养。培养物在早期以造血细胞成分居多, 随培养时间延长, 造血细胞不断坏死破碎, 并因其不贴壁而随换液不断清除, 而间充质干细胞则黏附于培养皿得以纯化。此法操作简易, 但依此法得到的间充质干细胞均一性较差, 抗原特性差异也较大, 部分细胞仍保留造血系细胞的特异抗原^[12]。

密度梯度离心法: 1999年Pittenger等^[13]首次根据骨髓中细胞成分的密度不同, 采用1.073 g/mL的Percoll密度梯度离心法来实现细胞间的分离, 清除红细胞, 吸取中间的单个核细胞层进行贴壁培养。并依据间充质干细胞易贴附在塑料培养物上生长的特性, 将其与非贴壁细胞分离。贴壁筛选法在接种时保留造血干细胞, 以后利用间充质干细胞贴壁生长的特性将其分离纯化, 而造血干细胞在换液时被逐步清除, 从而达到纯化的目的。此类细胞同源性更强, 具有更强的自我更新能力和多向分化潜能。被认为是比CFU-F更纯的间充质干细胞。同时值得注意的是, 不同密度的分离液对间充质干细胞的纯度影响也极大。Majumdar等^[14]比较Percoll和Ficoll分离的骨髓标本, 提出Percoll分离者形态更均匀, 表型更独特。但代飞等^[15]观察比较了Percoll(1.073 g/mL)与Ficoll(1.077 g/mL)分离人骨髓间充质干细胞的情况, 发现与Percoll比较, Ficoll密度梯度离心法可降低离心对细胞的损害, 简化操作步骤, 缩短分离时间, 减少了污染机会, 这提示对间充质干细胞而言, Ficoll密度梯度离心法行之有效。

免疫磁珠或流式细胞仪分选法: 通过间充质干细胞体积小、相对缺少颗粒的特性, 根据间充质干细胞表面带有或缺失的抗原成分进行正选或负选, 用抗体包被磁珠, 从而获得相对纯化的间充质干细胞。但由于磁珠分选法和流式细胞仪分选法对细胞活性影响较大, 实验条件要求高, 需要大量的骨髓, 且至今间充质干细胞特有的标记分子也没确定, 所以尚无分选间充质干细胞的标准方法, 目前偶用作间充质干细胞的鉴定^[16-17]。故这次实验选取健康成人骨髓液, 采用Ficoll密度梯度离心法获得单个核细胞, 经由贴壁培养传代至第3代细胞可获得纯度较高的间充质干细胞。

间充质干细胞具有多向分化潜能, 增殖能力强, 易于在体外大量培养, 并且可以特异迁移到损伤部位及肿瘤局部, 向骨组织, 心肌, 软骨组织, 肌肉等分化, 已经证实可治疗心肌梗死、脑梗死^[1-2]、急慢性肝功能衰竭

等^[3-4], 显示了其强大的临床应用价值。但正常人骨髓中间充质干细胞含量很低, 仅为0.001%~0.01%^[13], 需进行体外扩增方可满足细胞治疗的需求。有研究显示, 在体外培养扩增过程中, 间充质干细胞的干细胞特性呈程序性丢失^[18], 但多认为在第8代以前较少发生核型变异, 为实验研究及临床应用的良好对象^[19]。这次实验中选取培养至第3, 5, 7代的间充质干细胞, 发现随着传代次数增加, 间充质干细胞的形态从细长梭形的细胞逐渐缩短变宽, 增殖速率及总体扩增倍数亦随传代呈下降趋势, 与夏文杰等^[19]的报道相似。

3.2 不同来源间充质干细胞的表面抗原与因子表达 由于间充质干细胞缺乏特异性的表面标志物, 因而骨髓细胞体外培养较难获得纯的间充质干细胞, 目前对于鉴定间充质干细胞也主要是根据它的形态、功能等, 而且不同来源的间充质干细胞的表面标志物也不尽相同。

骨髓来源的间充质干细胞表面抗原表达较稳定的有: SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124, 间充质干细胞还可表达细胞因子和生长因子及其受体、白细胞介素类、黏附分子等具有间质细胞特征和无特异性的表面标记物, 不表达造血细胞系的特征性标记物CD45、CD34、CD14等^[13, 20]。国内一些研究采用流式细胞分析仪检测结果显示, 骨髓来源的间充质干细胞表面标记物CD29、CD44、CD73、CD166、CD105阳性, 而CD14、CD34、CD45、CD54、CD80、CD86和HLA-DR为阴性^[19, 21-23]。且扩增后的各代骨髓间充质干细胞的CD29、CD34、CD44、CD45、CD166及HLA-DR的表达阳性率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)^[24]。

脐带来源的间充质干细胞表达CD29、CD44、CD51、CD105、SH2、SH3, 不表达CD34、CD45^[25]。胎盘来源的间充质干细胞表达的标志物有CD105、SH-2、SH-3及SH-4, 同时表达某些胚胎干细胞表面标志物, 如SSEA-4、TRA-1-61及TRA-1-80等, 不表达造血细胞、内皮细胞及滋养层细胞的特殊细胞标志物^[26]。脂肪间充质干细胞表达CD49, 而骨髓来源的间充质干细胞不表达; 脂肪间充质干细胞不表达CD106, 而骨髓来源的间充质干细胞表达^[27]。

3.3 间充质干细胞归巢相关因子的生物学特点 趋化因子是具有多种生物学功能的小分子蛋白质, 是细胞因子家族中的重要成员。根据其氨基端(N端)前2个半胱氨酸位置将趋化因子分为4类: C类、CC类、CXC类和CX3C类, 相应受体分别称为CR、CCR、CXCR和CX3CR。趋化因子和趋化因子受体是免疫细胞归巢和定向趋化的关键分子, 能吸引免疫细胞到炎症局部, 参与免疫调节和免疫病理反应。近期的研究表明, 趋化因子受体在肿瘤转移的过程中也发挥关键的作用。肿瘤细

胞往往少量表达特异性的趋化因子受体, 而其配体则在转移的靶器官大量表达, 肿瘤细胞则循其配体的浓度梯度定向转移。

人类SDF-1基因位于10q11.1位点, 编码89和93个氨基酸多肽, 为趋化因子CXC亚家族成员, 命名为CXCL12。SDF-1是一种分泌型因子, 在骨髓、肝、脑、心、肾、脾脏等部位都有表达, 对造血干细胞/祖细胞的归巢、迁移、增殖、分化以及存活等起重要作用, 特别是对间充质干细胞的定向迁移表现出较强的趋化能力^[28-31]。

CXCR4是一个G蛋白耦联的7次跨膜受体, 是SDF-1惟一的受体。CXCR4在血液、免疫和中枢神经系统细胞上广泛表达, 研究表明, 在间充质干细胞的表面有CXCR4的表达^[32-34], 并参与其迁移能力的调节^[7]。CXCR4通过骨髓和外周血之间建立的SDF-1浓度梯度, 在促进骨髓移植后造血干细胞的归巢过程中发挥关键性作用^[35-36]。而大量的基础研究也表明, 表达CXCR4的间充质干细胞同样可以顺SDF-1浓度梯度迁移^[34, 37]。Wynn等^[34]研究发现骨髓间充质干细胞能表达较高水平的CXCR4, 但随着传代次数的增加, CXCR4表达逐渐降低并且向SDF-1迁移的能力也随之降低。

CXCR6是1997年发现的趋化因子受体家族成员^[38-39], 是CXCL16的惟一受体, 主要表达于记忆性T细胞及激活的T细胞, 包括辅助T细胞及效应T细胞^[40]。Sordi^[8]及Honczarenko等^[41]均在人来源的骨髓间充质干细胞表面检测到CXCR6的表达。高表达CXCR6可以显著提高细胞的迁移运动能力, 尤其是当配体CXCL16存在时, 这种诱导趋化的效应更加明显。

细胞黏附分子是指细胞产生、存在于细胞表面、介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合的一类分子。一般可分为整合素、免疫球蛋白、超基因家族、选择素、钙黏附素和CD44等5类。CD44系间充质干细胞表面标志之一, 间充质干细胞可能通过CD44与组织中的胶原等结合而定居归巢^[9-10]。CD44的表达下降, 可降低其与组织的结合能力, 从而影响间充质干细胞的归巢。

归巢一词起源于骨髓移植疗法的开展, 其意义为经静脉输入的干细胞通过血液循环特定地植入到支持其生长发育的骨髓微环境中的过程。随着研究范围的扩展, 目前归巢的意义已扩展为骨髓干细胞在特定条件下移行并定位于机体靶器官或靶组织的过程。虽然骨髓间充质干细胞大部分存留在骨髓组织, 仍有部分细胞处于休眠期, 散在分布于许多其他组织^[42-43]。当机体遭遇损伤或存在慢性炎症时, 损伤部位或炎症区域会释放特殊的内分泌信号, 局部表达及分泌多种趋化因子、黏附因子、生长因子, 这一系列微环境改变是间充质干细胞归巢的始动因素, 导致骨髓池干细胞动员至外周血, 并向损伤部位迁移^[8, 44-45], 损伤组织同

时表达特异性受体或配体引导对应的干细胞移动并黏附于损伤处^[46]。

目前对间充质干细胞迁移归巢的研究显示靶组织中植入间充质干细胞检出率比例较低,可能与间充质干细胞经血管迁移到达靶向组织并定植(即归巢)的能力有关^[47]。许多动物实验及临床研究表明,间充质干细胞归巢的数量与移植疗效密切相关^[48-49]。由于目前的培养技术难以在短期内获得大量纯度较高的间充质干细胞,且间充质干细胞移植后在体内的归巢能力会随着供体细胞在体外培养传代次数的增加而下降。因此除了移植较高数量级的干细胞外,提高间充质干细胞向靶器官的归巢能力是改善干细胞移植疗效的关键。

CXCR4、CXCR6、CXCL12及CD44是在间充质干细胞归巢过程中起重要作用的化学因子,作者通过Real-time PCR方法检测到传代扩增后的间充质干细胞中CXCR4、CXCR6、CXCL12及CD44的表达显著下调,提示间充质干细胞的归巢能力随扩增和传代的下降可能与CXCR4、CXCR6、CXCL12(SDF-1)、CD44等归巢相关因子的表达下降有关。因此设想上调这些化学因子的表达,可能是提高间充质干细胞向靶器官归巢的一个值得探索的途径,需要未来实验研究的进一步的深入探索,从而为临床细胞治疗提供更加有力的武器。

致谢: 感谢骨髓供者及国家自然科学基金面上项目、天津市中青年骨干创新人才培养计划的基金资助。

作者贡献: 许雯负责主要的实验设计、具体实施、数据统计及论文撰写;田晨负责部分实验操作指导;李芳、夏冰、郭青协助完成部分实验;张翼鸞负责实验指导及文章修改。

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: 实验方案均获得供者知情同意,并通过伦理审查。课题组成员均具有丰富的血液肿瘤方面的临床知识与基础研究经验。

学术术语: 归巢-归巢一词起源于骨髓移植疗法的开展,其意义为经静脉输入的干细胞通过血液循环特定地植入到支持其生长发育的骨髓微环境中的过程。

随着研究范围的扩展,目前归巢的意义已扩展为骨髓干细胞在特定条件下移行并定位于机体靶器官或靶组织的过程。当机体遭遇损伤或存在慢性炎症时,损伤部位或炎症区域会释放特殊的内分泌信号,局部表达及分泌多种趋化因子、黏附因子、生长因子,这一系列微环境改变是间充质干细胞归巢的始动因素,导致骨髓池干细胞动员至外周血,并向损伤部位迁移,损伤组织同时表达特异性受体或配体引导对应的干细胞移动并黏附于损伤处。

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 References

- [1] Qu C, Mahmood A, Lu D, et al. Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain Res.* 2008;4: 234-239.
- [2] Carvalho JL, Braqa VB, Melo MB, et al. Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2013.
- [3] Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology.* 2011;54(3): 820-828.
- [4] Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem.* 2007; 40(12): 893-899.
- [5] Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* 2003;17(1):160-170.
- [6] Roland J, Murphy BJ, Ahr B, et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1 mediated signaling. *Blood.* 2003; 101(2):399-406.
- [7] Lee RH, Hsu SC, Munoz J, et al. A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood.* 2006; 107(5): 2153-2161.
- [8] Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005;106 (2): 419-427.
- [9] Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med.* 2008;14(2):181-187.
- [10] Morimoto K, Robin E, Le Bousse-Kerdiles MC, et al. CD44 mediates hyaluronan binding by human myeloid KG1A and KG1 cells. *Blood.* 1994;83(3):657-662.
- [11] 许雯,张翼鸞 赵丹丹,等.微孔膜法比较Stro-1+和Stro-1-间充质干细胞的免疫调节作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2012, 16(1):111-115.
- [12] Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, et al. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;72(4):570-585.
- [13] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [14] Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998;176(1):57-66.
- [15] 代飞,吴军,许建中,等.两种从骨髓中分离人间充质干细胞方法的比较研究[J].第三军医大学学报,2005,27(16):1631-1633.
- [16] 颀玉欣,王旭,张进贵.间充质干细胞的研究进展[J].河北医药, 2005,27(2):130-132.
- [17] 王蓓,汪维伟.间充质干细胞的研究进展[J].国外医学:外科学分册,2005,32(6):459-462.

- [18] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-192.
- [19] 夏文杰, 许茹, 叶欣, 等. 人骨髓间充质干细胞体外扩增的生物学评估[J]. *中国实验学血液学杂志*, 2008, 16(3):639-644.
- [20] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
- [21] 赛音其木格, 侯相麟, 赵丽, 等. 成人骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的研究[J]. *临床血液学杂志*, 2005, 18(4):200-203.
- [22] 易敬林, 杨海军, 丁伟荣, 等. 人骨髓间充质干细胞的分离培养及其生物学特性的研究[J]. *江西医学院学报*, 2005, 45(6):1-5.
- [23] 房佰俊, 韩钦, 杨少光, 等. TGF β -1对成人骨髓CD105⁺间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. *西安交通大学学报*, 2005, 26(3):228-231.
- [24] 罗依, 梁彬, 余勤. 成人骨髓间充质干细胞体外培养扩增及其生物学特性研究[J]. *浙江医学*. 2003, 25(8):468-469, 473
- [25] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-1337.
- [26] Feldmann RE Jr, Bieback K, Maurer MH, et al. Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis*. 2005; 26(14):2749-2758.
- [27] Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005; 87(1):125-128.
- [28] Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*. 2000;95(8):2505-2513.
- [29] Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, et al. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J*. 2005;19(10): 1225-1231.
- [30] Roland J, Murphy BJ, Ahr B, et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1 mediated signaling. *Blood*. 2003;101(2):399-406.
- [31] Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, et al. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol*. 2002; 168(6), 2609-2617.
- [32] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006;24(5):1254-1264.
- [33] Shi M, Li J, Liao L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007; 92(7):897-904.
- [34] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24(4): 1030-1041.
- [35] Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9): 973-981.
- [36] Petit L, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3(7): 687-694.
- [37] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006;7(1):19-24.
- [38] Alkhatib G, Liao F, Berger EA, et al. A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature*. 1997;388(6639):238.
- [39] Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, et al. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997;388(6639):296-300.
- [40] Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, et al. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol*. 2000;165(6):3284-3292.
- [41] Von Lutichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, et al. Human adult CD34⁺ progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):329-336.
- [42] van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, et al. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nat Protoc*. 2008;3(6): 1085-1091.
- [43] Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001;264(1): 51-62.
- [44] Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, et al. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007;137(6):491-502.
- [45] Wu Y, Wang J, Scott PG, et al. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen*. 2007; 15(Suppl 1):S18-26.
- [46] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24(4): 1030-1041.
- [47] Shi M, Li J, Liao L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007; 92(7):897-904.
- [48] Li Y, Yu X, Lin S, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(3):780-784.
- [49] Ma J, Ge J, Zhang S, et al. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(3):217-223.