

微重力影响间充质干细胞向软骨细胞分化的研究进展

梅满¹, 于波²

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院 山东 济南 250355)

摘要 关节软骨损伤的治疗是骨科研究的热点之一。软骨组织工程研究致力于通过构建细胞与生物材料的三维复合体, 形成具有生物活性的软骨组织, 在功能及形态方面完全替代缺损处的软骨, 以医治大面积的软骨缺损。但在重力环境下, 培养出的软骨细胞失去原有的细胞表型及电生理特性, 构建出的软骨组织只能在形态和生化成分上与原缺损处软骨组织相似。而微重力环境可影响间充质干细胞的增殖和分化, 有促进干细胞向软骨细胞分化的作用。本文从微重力环境的建立和优点、微重力对间充质干细胞向软骨细胞分化的影响两大方面, 对近年来的研究进展进行了综述。

关键词 软骨; 软骨细胞; 间质干细胞; 细胞分化; 组织工程; 失重模拟; 综述

由于关节软骨血供匮乏及损伤后自身修复能力有限, 关节软骨损伤的治疗往往难以取得良好的效果, 也因此成为骨科研究的热点之一^[1]。目前临床上治疗关节软骨损伤的方式主要有两种: 自体软骨移植和异体软骨移植。但前者存在并发供区病变、增加创伤和移植软骨退化不稳定等缺点^[2], 而后者存在并发免疫排斥反应、移植物生物活性差等缺点^[3]。近年来, 随着组织工程学的快速发展, 关节软骨损伤修复的研究热点也逐渐转向组织工程领域。软骨组织工程研究致力于通过构建细胞与生物材料的三维复合体, 形成具有生物活性的软骨组织, 在功能及形态方面完全替代缺损处的软骨, 以医治大面积的软骨缺损。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能, 这一生物特性使其成为组织工程研究中理想的“种子细胞”^[4]。但 MSCs 的增殖分化受多种因素的影响。重力环境培养下, MSCs 多沉积在载体底部, 载体中心的细胞数量减少, 细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的三维随机组合及共同定位受到限制, 细胞有可能分化成肥大的软骨细胞或成骨细胞^[5], 使培养出的软骨细胞失去原有的细胞表型及电生理特性^[6], 构建出的软骨组织只能在形态和生化成分上与原缺损处软骨组织相似。随着空间科学技术及载人航天工程的发展, 微重力对人体生命活动的影响成为研究的热点, 学者们对微重力环境下 MSCs 的增殖分化有了一些认识。本文对近年来关于微重力

影响 MSCs 向软骨细胞分化的研究进展进行综述。

1 微重力环境的建立和优点

微重力细胞培养环境的建立主要是建立由高分子可降解聚合物支架、胶原和微载体形成的三维细胞培养系统。由美国国家航空与宇宙航行局制造的模拟微重力环境的生物反应器——旋转微重力系统(rotary cell culture system, RCCS), 通过产生层流以减轻作用于细胞聚集体的机械应力, 为细胞的三维生长提供基质和丰富的供氧。与传统二维培养体系相比, RCCS 具有以下优点: ①在类似于无重力的环境中培养细胞, 可抵消流体剪切力, 产生适宜的低剪切力, 对细胞增殖分化的周期产生作用, 从而影响干细胞的定向分化; ②改善营养和代谢产物的交换, 保持培养环境的同质性和稳定性, 促进细胞增殖; ③形成特定的细胞外基质, 促进细胞的分化和成熟; ④消除不同种类细胞之间的沉浮、对流等物理现象, 使细胞与细胞、细胞与细胞外基质形成三维聚集物; ⑤组织培养保真度高^[7-9]。

2 微重力对 MSCs 向软骨细胞分化的影响

2.1 影响培养细胞的分布 细胞的数量和分布是影响 MSCs 向软骨细胞分化的关键因素之一。体外构建软骨常用的方法是将细胞悬液滴于支架上, 依靠支架孔隙的分子间作用力和重力使细胞滞留于支架内^[10]。这种组织构建模式容易发生细胞在支架内分布不均或脱落^[11]。刘天一等^[12]采用块状聚羟基乙酸三维支架(polyglycolic acid, PGA)载体负载 MSCs 进行体外软骨诱导, 发现虽然能够形成软骨组织, 但软骨形成不完全, 中心部位无软骨特异性 II 型胶原合成, 存在“空心现象”。林威等^[13]采用三维 I 型胶原支架负载 MSCs 置于旋壁式生物反应器中进行微重

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2016HM43), 山东省医药卫生科技发展计划面上项目(2016WS0582), 山东省济南市科技计划项目(201602183)

通讯作者: 于波 E-mail: dangxiao1976@126.com

力培养,结果显示软骨细胞在支架内部的分布情况较静态培养组明显要均一,避免了“空心现象”。微重力培养为 MSCs 分化提供了动态三维环境,使得培养环境更接近人体环境,而适宜的培养环境更有利于软骨组织的形成^[14]。

2.2 介导相关信号通路 力学刺激对于软骨的正常发育及成熟有着重要影响^[15]。在一定力学刺激下, SOX 转录因子 9 (SRY-related high mobility group-box gene9, SOX9)、Runt 相关转录因子 2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 等表达水平增加,这些信号通路与软骨的合成密切相关。微重力条件下产生的低剪切力可对细胞产生有规律的机械刺激,这种刺激能介导相关信号通路,从而对 MSCs 成软骨分化产生一定影响。整合素是细胞接受和传导力学信号最重要的途径之一。整合素能够感受胞外力学信号后,将其转化为化学信号并整合成胞内信号,再通过细胞骨架、MAPK 信号通路等调节一系列的细胞生物学行为^[16]。BMP、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、p38MAPK 及 Wnt/ β -catenin 等信号通路也可能参与微重力环境下 MSCs 向软骨细胞分化的调控。

2.3 影响细胞外基质 微重力可增强细胞之间及细胞与细胞外基质间的联系,可通过激活沉默信息调节蛋白 1 增强 SOX9 转录,从而增加下游靶基因 II 型胶原的表达^[17-18]。Wu 等^[19]采用微重力下 PGA 诱导 MSCs 构建软骨组织,发现旋转培养组细胞外基质中 II 型胶原及蛋白多糖含量均高于静态培养组。微重力可促进胶原和葡糖胺聚糖等的形成。TGF- β 1 可缓慢激活 p38 蛋白磷酸化,但在微重力作用下,p38 蛋白磷酸化被快速激活并维持高水平,可促进 II 型胶原、SOX9、蛋白聚糖等软骨细胞标志基因的表达^[20]。

2.4 抑制 MSCs 的肥大老化和向成骨细胞分化 抑制种子细胞 MSCs 的肥大老化和成骨分化也是软骨组织培养中的一项难题。模拟微重力环境下,软骨形成过程中胶原蛋白 X 的表达明显下降^[21], COL10A1 的表达同样降低^[22]。而胶原蛋白 X 和 COL10A1 是软骨细胞肥大老化的标志基因,说明微重力可抑制 MSCs 的肥大老化。Zhang 等^[23]利用返回式科学卫星观察微重力条件下 MSCs 的分化,结果表明在微重力条件下,Runt 相关转录因子 2 等 10 个基因特异性表达的成骨胶原减少,瘦素、过氧化物增殖物激活受体 γ 编码基因等 4 个基因的特异性表达增加。微重力

环境下,可诱导 MSCs 成骨分化的骨形态发生蛋白-2 和信号传导蛋白 SMAD1/5/9 活性同样下降^[24]。这些研究结果说明微重力可抑制 MSCs 向成骨细胞分化^[24]。

3 小 结

微重力环境为软骨组织工程培养提供了近似于人体的环境,微重力下诱导干细胞成软骨分化为人类治疗大面积软骨缺损提供了丰富的材料,使软骨组织工程研究进入新的阶段。虽然微重力在促进干细胞成软骨分化方面起着重要的作用,但还有很多问题尚未解决。由组织工程构建的软骨组织在组织构成、电生理及力学特性方面仍无法与原有软骨相兼容。在当前研究条件下,模拟的微重力环境只是近似于无重力环境,如何创建成体系的适宜细胞分化的力学环境依然是较大挑战。且虽然微重力可促使一些软骨生化成分及标记物的形成,但力学作用的频率、量级、时间对软骨组织形成的影响尚需深入探索;力学因素通过哪些通路作用于细胞及细胞基质也需要进一步研究。进一步了解 MSCs 成软骨分化过程中调控因子和力学因素作用的具体机制,选择出最佳的诱导成分和力学作用方式,对在微重力下诱导出分子构成、电生理及力学特性与原缺损区软骨一致的工程软骨将有重大的意义。

4 参考文献

- [1] MELLOR LF, STEWARD AJ, NORDBERG RC, et al. Comparison of Simulated Microgravity and Hydrostatic Pressure for Chondrogenesis of hASC[J]. *Aerosp Med Hum Perform*, 2017, 88(4):377-384.
- [2] HINTERMANN B, WAGENER J, KNUPP M, et al. Treatment of extended osteochondral lesions of the talus with a free vascularised bone graft from the medial condyle of the femur[J]. *Bone Joint J*, 2015, 97-B(9):1242-1249.
- [3] RIFF AJ, YANKE AB, SHIN JJ, et al. Midterm results of osteochondral allograft transplantation to the humeral head[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2017, 26(7):e207-e215.
- [4] SAEED H, AHSAN M, SALEEM Z, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23:41.
- [5] CHENG T, MADDOX NC, WONG AW, et al. Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and differentiated articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(2):234-245.
- [6] 周爽,李莹,詹渊博,等.骨髓间充质干细胞体外有效扩增的研究新进展[J]. *现代口腔医学杂志*, 2017, 31(3):

- 154 - 157.
- [7] KANG HJ, LU SB, PENG J, et al. Chondrogenic differentiation of human adipose - derived stem cells using microcarrier and bioreactor combination technique[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1195 - 1199.
- [8] WANG N, WANG H, CHEN J, et al. The simulated microgravity enhances multipotential differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(1): 119 - 131.
- [9] PAO SI, CHIEN KH, LIN HT, et al. Effect of microgravity on the mesenchymal stem cell characteristics of limbal fibroblasts[J]. *J Chin Med Assoc*, 2017, 80(9): 595 - 607.
- [10] GASPAR DA, GOMIDE V, MONTEIRO FJ. The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering[J]. *Biomater*, 2012, 2(4): 167 - 175.
- [11] BERENZI A, STEIMBERG N, BONIOTTI JA. MRT letter: 3D culture of isolated cells: a fast and efficient method for optimizing their histochemical and immunocytochemical analyses[J]. *Microsc Res Tech*, 2015, 78(4): 249 - 254.
- [12] 刘天一, 周广东, 苗春雷, 等. TGF - β 1 和 IGF - I 和地塞米松诱导 BMSCs 体外构建组织工程化软骨[J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(4): 262 - 266.
- [13] 林威, 陈洁琳, 刘威, 等. 模拟微重力动态培养构建组织工程化软骨修复猪关节软骨缺损研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(5): 432 - 437.
- [14] KALE S, BIERMANN S, EDWARDS C, et al. Three - dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9): 954 - 958.
- [15] STEWARD AJ, KELLY DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation[J]. *J Anat*, 2015, 227(6): 717 - 731.
- [16] 刘鹏程, 刘宽, 刘俊峰, 等. 旋转微重力细胞培养系统下 Indian hedgehog 转染兔 BMSCs 促进成软骨分化并抑制老化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(7): 892 - 902.
- [17] LEI XH, DENG ZL, ZHANG HS, et al. Rotary suspension culture enhances mesendoderm differentiation of embryonic stem cells through modulation of Wnt/ β - catenin pathway[J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(4): 526 - 538.
- [18] SAMBANDAM Y, TOWNSEND MT, PIERCE JJ, et al. Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis[J]. *Bone*, 2014, 61: 125 - 131.
- [19] WU X, LI SH, LOU LM, et al. The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 331 - 336.
- [20] YU B, YU D, CAO L, et al. Simulated microgravity using a rotary cell culture system promotes chondrogenesis of human adipose - derived mesenchymal stem cells via the p38 MAPK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(2): 412 - 418.
- [21] MAYER - WAGNER S, HAMMERSCHMID F, REDEKER J, et al. Simulated microgravity affects chondrogenesis and hypertrophy of human mesenchymal stem cells[J]. *Int Orthop*, 2014, 38(12): 2615 - 2621.
- [22] GU J, LU Y, LI F, et al. Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1469.
- [23] ZHANG C, LI L, JIANG YD, et al. Space microgravity drives transdifferentiation of human bone marrow - derived mesenchymal stem cells from osteogenesis to adipogenesis[J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4444 - 4458.
- [24] HUANG Y, DAI ZQ, LING SK, et al. Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16(1): 87.

(收稿日期: 2018-04-18 本文编辑: 杨雅)

(上接第 37 页)

- [15] CUNHA MT, VERRI WA J, FUKADA SY, et al. TNF - α and IL - 1 β mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 573(1 - 3): 221 - 229.
- [16] 刘改红. 肌筋膜疼痛扳机点的药物注射治疗效果观察和机制探索[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [17] CUMMINGS M, BALDRY P. Regional myofascial pain; diagnosis and management[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2007, 21(2): 367 - 387.
- [18] DESAI MJ, SAINI V, SAINI S. Myofascial pain syndrome: a treatment review[J]. *PainTher*, 2013, 2(1): 21 - 36.
- [19] 叶玲, 曾友华. 腰臀部肌筋膜痛患者激痛点针刺治疗的疼痛及功能改善分析[J]. *浙江创伤外科*, 2018, 23(2): 390 - 392.
- [20] 徐蕾. 温针灸配合茯苓汤内服治疗肩周炎 67 例[J]. *中医正骨*, 2016, 24(6): 68.
- [21] 闵学进. 温针灸配合走罐治疗腰肌劳损疗效观察[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2010, 8(17): 230 - 231.
- [22] 赵家胜. 腰背肌筋膜与腰背肌筋膜炎诊治的机理研究[J]. *针灸临床杂志*, 2004, 20(3): 24 - 25.
- [23] 张芸, 谢晓焜. 温针灸治疗腰臀部肌筋膜炎 44 例[J]. *福建中医药*, 2010, 41(6): 27 - 28.

(收稿日期: 2018-07-24 本文编辑: 杨雅)