

# 促进骨髓间充质干细胞增殖方法的研究进展

于海生<sup>1\*</sup>, 王宁<sup>2#</sup>(1.重钢总医院超声科, 重庆 400084; 2.重庆市肿瘤医院超声科, 重庆 400030)

中图分类号 R913; Q26 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)37-3532-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.37.26

**摘要** 目的: 寻求促进骨髓间充质干细胞增殖更加安全、有效的方法。方法: 以“骨髓间充质干细胞”“种子细胞”“组织工程学”“细胞增殖”等的中、英文词汇为关键词, 组合检索2000—2013年中国知网、万方数据库、PubMed等的相关文献, 综述有关促进骨髓间充质干细胞增殖的方法。结果与结论: 共查询到文献106篇, 其中有效文献27篇。经分析表明, 目前促进骨髓间充质干细胞增殖的方法主要包括中药诱导、电磁场刺激、细胞外基质结合、机械刺激、生长因子调节、基因转染等。其中, 中药诱导、电磁场刺激相比其他几种方法具有价格低廉、操作简便等优点, 已形成产品并应用于临床。但每种扩增方法均或多或少存在着作用机制不够明确、成本较高、技术难度较大等问题, 尚需进一步深入研究, 以寻求更加安全、高效的方法。

**关键词** 骨髓间充质干细胞; 种子细胞; 组织工程学; 细胞增殖

间充质干细胞属于中胚层的一类多能干细胞, 主要存在于结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含量为最丰富, 因此统称骨髓间充质干细胞(Bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。BMSCs具有来源方便且易于分离、培养、扩增和纯化等特点, 多次传代扩增后仍具有干细胞特性, 在一定的诱导条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、神经细胞和脂肪细胞等多种组织细胞, 且免疫原性弱。因此, BMSCs作为组织工程学中的理想种子细胞受到了越来越多学者的重视<sup>[1-4]</sup>。

研究表明, 生产组织工程化产品要获得临床的广泛应用, 需要大量的种子细胞<sup>[5]</sup>。尽管骨髓中BMSCs的含量相对较多, 但在正常状态下生长缓慢, 而且随着年龄增加BMSCs的数量将逐渐减少。因此, 要想获得数量多、活性高、分化功能良好的种子细胞以满足组织工程学应用要求, 就必须对BMSCs进行扩增。因此, 如何通过有效的技术手段来获得大规模、具有再生活力的种子细胞, 成为了当前组织工程研究亟需解决的关键问题。本文以“骨髓间充质干细胞”“种子细胞”“组织工程学”“细胞增殖”等的中、英文词汇为关键词, 组合检索2000—2013年中国知网、万方数据库、PubMed等中的文献, 结果共查询到文献106篇, 其中有效文献27篇, 现对有关促进骨髓间充质干细胞增殖的方法进行综述。

## 1 中药对BMSCs增殖的影响

目前, 中药促进BMSCs的增殖研究取得了很大进展。中药具有滋阴补阳、强身壮体、增智健脑、抗衰老和调节免疫功能、毒副作用小、疗效好等特点, 被广泛应用于诱导BMSCs增殖研究中, 并已形成产品应用于临床中以促进BMSCs增殖, 如将中药用于治疗骨质疏松和骨折修复等。中药主要通过调动或调整机体细胞内在机制以促进BMSCs增殖。Chen DF等<sup>[6]</sup>研究发现, 龟板提取物能够促进BMSCs增殖, 细胞增殖活性明显活跃。同时, 筛选龟板提取物有效浓度范围为0.01~3.0 mg/ml, 经细胞周期分析表明, 龟板提取物能增加处于S期(增殖期)BMSCs的比例, 并证明了龟板提取物的主要化学成分(主要含有脂肪酸、类固醇及氨基酸等)和药理活性的机制。刘国岩等<sup>[7]</sup>利用不同质量浓度骨碎补(0.2、2、20 mg/ml)促进BMSCs增殖, 研究表明增殖活性因子之一碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达增加, 成骨能力明显增强, 从而加速了BMSCs增殖, 其中以质量浓度2 mg/ml促进作用最为明显。黄进等<sup>[8]</sup>利用黄芪多糖体外促进BMSCs增殖, 1、2、3 mg/ml黄芪多糖组均具有促进BMSCs增殖, MTT检测细胞吸光值(0.499 8 ± 0.005)、(0.496 3 ± 0.005)、(0.472 5 ± 0.005)明显高于空白对照组(0.360 8 ± 0.005), 其中以1 mg/ml促进作用最为明显( $P < 0.01$ )。

虽然中药促进BMSCs的增殖取得了很大进展, 但是中药

- [21] Seo TG, Kim DH, Ramasamy T, *et al.* Development of docetaxel-loaded solid self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for enhanced chemotherapeutic effect [J]. *Int J Pharm*, 2013, 452(1/2): 412.
- [22] Kutza C, Metz H, Kutza J, *et al.* Toward a detailed characterization of oil adsorbates as “solid liquids” [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 84(1): 173.
- [23] Jain S, Jain AK, Pohekar M, *et al.* Novel self-emulsifying formulation of quercetin for improved in vivo antioxidant potential: implications for drug-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity [J]. *Free Radical Biol Med*, 2013, 65:

- 117.
- [24] Ujhelyi Z, Fenyvesi F, Váradi J, *et al.* Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-microemulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(3): 564.
- [25] Shanmugam S, Park JH, Kim KS, *et al.* Enhanced bioavailability and retinal accumulation of lutein from self-emulsifying phospholipid suspension (SEPS) [J]. *Int J Pharm*, 2011, 412(1/2): 99.
- [26] Qi XL, Wang L, Zhu J, *et al.* Self-double-emulsifying drug delivery system (SDEDDS): a new way for oral delivery of drugs with high solubility and low permeability [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1/2): 245.

(收稿日期: 2013-11-29 修回日期: 2014-01-08)

\* 住院医师, 硕士研究生。研究方向: 超声诊断。电话: 023-68840690。E-mail: yuhaisheng111305@sina.com

# 通信作者: 住院医师。研究方向: 超声诊断。电话: 023-65301201。E-mail: 471435535@qq.com

促进 BMSCs 增殖尚存在以下问题:中药强调的是多靶点体系与分子之间的协同作用,而且中药组织成分复杂,多为复方用药,其有效化学成分难以明确,不能高效利用;再者,中药与 BMSCs 的量效关系、药理作用及其作用机制尚不十分清楚。因此,今后应加强对此类中药进行有效分子水平活性成分提取,以确定中药的有效成分,并对其作用机制进行深入研究,从细胞水平、分子水平或基因水平方面揭示中药促进 BMSCs 增殖的机制具有重要意义。

## 2 电磁场对 BMSCs 增殖的影响

研究表明,脉冲电磁场(Pulsed electromagnetic fields, PEMFs)可促进骨组织的愈合和重建,具有促进种子细胞增殖及转化、刺激骨局部生长因子分泌、合成细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)和加速骨的发育等多种作用。目前,临床上利用电磁场设备进行骨折延迟愈合、骨不连结、骨质疏松等治疗,具有效果显著、操作简便、费用低廉等特点<sup>[9-11]</sup>。

电磁场频率在 1~100 Hz 范围时会对组织和细胞产生生物学效应,而人体骨骼系统的内生性活动频率范围在步态频率(1~5 Hz)到肌肉收缩的动力频率(10~100 Hz)间变化。Lee JH 等<sup>[12]</sup>认为,最有效的电磁场频率范围应该与机体正常功能活动频率相接近,才能使电磁场发挥最大的刺激功效作用。Liu C 等<sup>[13]</sup>利用电磁场强度 1 mT,频率为 10、30、50、70 Hz 刺激体外培养的第 3 代 BMSCs,刺激时间 2 h,发现电磁场频率 10 Hz 时能够大幅提升 BMSCs 增殖标志物碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素的表达, BMSCs 增殖活性明显增强。然而,电磁场频率在 50、70 Hz 时, BMSCs 细胞增殖活性反而下降。

目前,PEMFs 作用于 BMSCs 的增殖机制还不够明确,虽然已形成产品并应用于临床,但是仅在小范围内应用,如何获得更大规模、安全高效的应用,还有待进一步研究。

## 3 ECM 对 BMSCs 增殖的影响

ECM 由大分子构成,其构成错综复杂,能为细胞的生长及活动提供适宜的场所。研究表明,ECM 可通过自身所带电荷先吸附到培养仪器表面,然后 BMSCs 再与 ECM 结合,从而加速 BMSCs 黏附和贴壁,细胞与基质这种黏附对于调节细胞生长和增殖行为十分重要<sup>[14]</sup>。

Jager M 等<sup>[15]</sup>将 BMSCs 分别接种到 D, D, L, L-聚交酯(PLLA)、I/III 型胶原以及聚乳酸-910/聚二氧环己酮(PGPD)3 种支架上。结果发现,4 h 后镜下观察 I/III 型胶原上 BMSCs 的贴壁数量明显多于其他两个支架细胞(胶原>PLLA>PCPD)。ECM 促进 BMSCs 增殖的机制目前还不完全清楚,但 Larsen M<sup>[16]</sup>等推测其促进增殖的机制可能与化学信号通过整合素-黏着斑(Focal adhesion plaques, FAP)激酶-胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)途径传递有关。整合素的胞外区与 ECM 相连,胞内区与细胞骨架相接,形成 FAP,由此将 ECM 产生的化学信号传递到细胞内,调节 BMSCs 的生长、增殖、迁移等过程。但是,ECM 这种促进 BMSCs 增殖的机制还有待证实,相应的技术路线仍需进一步完善。

## 4 机械刺激对 BMSCs 增殖的影响

机械刺激对 BMSCs 的体外增殖也有重要的调节作用。机体细胞和组织器官处于一种复杂的力学微环境中, BMSCs 的增殖和分化高度依赖其所处的微环境<sup>[17-18]</sup>。Song G 等<sup>[19]</sup>研究发现,不同机械刺激的大小、作用方式及作用时间对 BMSCs 增殖分化的调节作用不尽相同。当机械刺激频率为 1 Hz、形变量为 5% 并分别拉伸 15、30、60 min 时,机械刺激能显著促进 BMSCs 增殖;当形变量增加至 10%、拉伸 60 min 时,细胞增殖

会受到抑制;继续增加形变量至 15%、拉伸 15 min 时则会抑制 BMSCs 增殖;将拉伸时间延长至 30、60 min 时则会再次促进 BMSCs 增殖;然而长时间的机械拉伸(12 h 或 24 h)对 BMSCs 增殖将起到抑制作用。经李晓娜等<sup>[20]</sup>证实,机械拉伸刺激能影响大鼠 BMSCs 的迁移行为,基质金属蛋白酶 2(Metalloproteinases, MMP-2)、MMP-9 在此过程中可能起着重要的介导作用,但具体机制目前还不够明确。

适当的机械力学刺激可促进体外细胞的增殖和功能的维持,但过度或持续时间过长的机械刺激又会对细胞的结构和功能造成损害<sup>[21]</sup>。目前,这种机械力作用的大小及作用机制还有待进一步研究。

## 5 生长因子对 BMSCs 增殖的影响

细胞因子是组织工程中的重要因素,其通过细胞间的信号传递来影响细胞活动,具有促进或抑制细胞分裂、增殖、迁移和基因表达等作用。生长因子的合理应用对组织工程起着关键作用,目前在骨组织中发现了十几种生长因子。其中, bFGF、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)和表皮生长因子(EGF)等多种细胞因子对 BMSCs 具有重要的调节作用,可促进细胞增殖和胶原合成、加速血管生长及在骨吸收改建方面发挥作用。因此,在组织工程对细胞因子合理使用或调控 BMSCs 的适时适量表达十分重要。研究表明, bFGF 是目前已知最强的促细胞生长因子<sup>[22]</sup>。Yuan S 等<sup>[23]</sup>研究发现,骨形态发生蛋白-4/7(Bone morphogenetic protein, BMP-4/7)能显著促进骨髓基质细胞的增殖( $P < 0.05$ );同时,也能促进 BMSCs 的成骨分化。BMP-4/7 和 bFGF 在促进细胞增殖时具有显著的协同作用。

随着分子生物学、生物化学不断深入研究,各种生长因子在组织工程中的作用日益受到重视。但其使用过程中还存在诸多问题:(1)生长因子与细胞增殖之间的量效关系、相互作用、协同或拮抗作用及其作用机制都不十分明确,因此细胞增殖是一个极其复杂的过程。经李斌等<sup>[24]</sup>证实, TGF- $\beta$ 1 分别与 bFGF、IGF-I 在诱导 BMSCs 形成软骨细胞的过程中具有协同作用。但各种生长因子之间的相互作用机制及量效关系目前尚不明确,需要长期的探究。(2)生长因子的生物活性难以控制,极易使种子细胞发生定向分化而变性,造成细胞基因突变,从而导致危险。(3)生产生长因子的费用较高。

## 6 转基因技术对 BMSCs 增殖的影响

转基因(Gene transfer)是指将外源目的基因通过载体转移到靶细胞内,以补偿靶细胞的基因缺陷。其主要作用是调节靶细胞蛋白质分泌水平,使靶细胞获得新的生物学行为和功能。利用转基因方法促进种子细胞增殖是当今组织工程研究中的又一热点。蒋柳宏等<sup>[25]</sup>利用脂质体转染法,将真核重组表达质粒(bFGF-pcDNA3)转染至体外培养的 BMSCs,筛选出稳定表达 bFGF 的 BMSCs 细胞株,并发现自身表达的 bFGF 可促进 BMSCs 增殖。Lin WP 等<sup>[26]</sup>利用转基因技术将生长因子 Neuroglobin 植入实验兔的 BMSCs,结果发现兔的损伤组织重塑和纤维束生长显著增快。目前,利用转基因技术已将人端粒逆转录酶(hTERT)基因成功转入中国贵州小猪的 BMSCs 内,发现转染后的 BMSCs 与正常培养的 BMSCs 具有相同的增殖活性,同时转染后的 BMSCs 寿命得到延长<sup>[27]</sup>。但是,这项技术也面临一些难题需要解决,如基因转染效率低、体内表达时间短、是否会导致恶变及转基因后能否保持原来的生物学特性等。目前,转基因技术还处于初步研究阶段,技术条件的不完善决定了其在短时间内难以全面推广应用。

## 7 结语

BMSCs作为组织工程学中的理想种子细胞,近年来受到学者们的广泛关注,已成为医学领域乃至整个生命科学领域的研究热点,如中药、电磁场扩增种子细胞都已形成产品应用于临床。对种子细胞的大量扩增是其要解决的关键问题。上述几种促进BMSCs增殖的方法,虽然在种子细胞的扩增方面起到了一定作用,但是每种方法都存在或多或少的缺陷,需要更加深入地进行探究。当前,利用上述方法对种子细胞进行大量扩增仍存在一定的局限性,还无法在短期内推广应用。展望未来,寻找一种更为简便、经济、安全、有效的扩增种子细胞的方法显得尤为重要。

## 参考文献

- [1] Mohammadian M, Shamsasenjan K, Lotfi NP, *et al.* Mesenchymal stem cells: new aspect in cell-based regenerative therapy[J]. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3(2): 433.
- [2] Yue Y, Yang X, Wei X, *et al.* Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells prompted by low-intensity pulsed ultrasound[J]. *Cell Prolif*, 2013, 46(3): 320.
- [3] Kim SM, Jung JU, Ryu JS, *et al.* Effects of gangliosides on the differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts by modulating epidermal growth factor receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 866.
- [4] Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis[J]. *Injury*, 2008, 39(1): 58.
- [5] Mahmoudifar N, Doran PM. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development[J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(3): 166.
- [6] Chen DF, Zeng HP, Du SH, *et al.* Extracts from plastrum testudinis promote proliferation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(2): 196.
- [7] 刘国岩,徐展望,徐琬梨.骨碎补提取物对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化及Cbfa-1表达的影响[J].*山东医药*, 2013, 53(25): 10.
- [8] 黄进,张进,徐志伟.黄芪多糖对体外培养骨髓间充质干细胞增殖和干细胞因子表达的刺激作用[J].*复旦学报:医学版*, 2011, 38(4): 343.
- [9] 冯玉,白文芳,许伟成,等.低频电磁场促进骨髓间充质干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的实验研究[J].*中国组织工程研究*, 2013, 17(32): 5 819.
- [10] Esposito M, Lucariello A, Riccio I, *et al.* Differentiation of human osteoprogenitor cells increases after treatment with pulsed electromagnetic fields[J]. *In Vivo*, 2012, 26(2): 299.
- [11] Jansen JHW, van der Jagt OP, Punt BJ, *et al.* Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study[J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2010, 11(1): 188.
- [12] Lee JH, McLeod KJ. Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields[J]. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21(2): 129.
- [13] Liu C, Yu J, Yang Y, *et al.* Effect of 1 mT sinusoidal electromagnetic fields on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2013, 34(6): 453.
- [14] Wei B, Jin C, Xu Y, *et al.* Effect of bone marrow mesenchymal stem cells-derived extracellular matrix scaffold on chondrogenic differentiation of marrow clot after microfracture of bone marrow stimulation in vitro[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2013, 27(4): 464.
- [15] Jager M, Feser T, Denck H, *et al.* Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro[J]. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33(10): 1 348.
- [16] Larsen M, Artym W, Green JA, *et al.* The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5): 463.
- [17] Wu Y, Zhang P, Dai Q, *et al.* Effect of mechanical stretch on the proliferation and differentiation of BMSCs from ovariectomized rats[J]. *Mol Cell Biomech*, 2013, 382(1/2): 273.
- [18] Rice KM, Kakarla SK, Mupparaju SP, *et al.* Shear stress activates Akt during vascular smooth muscle cell reorientation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 55(2): 85.
- [19] Song G, Ju Y, Soyama H, *et al.* Regulation of cyclic longitudinal mechanical stretch on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cell Biomech*, 2007, 4(4): 201.
- [20] 李晓娜,宋关斌,罗庆.机械拉伸对骨髓间充质干细胞迁移行为的影响[J].*中国生物工程杂志*, 2012, 32(5): 1.
- [21] Song G, Luo Q, Xu B, *et al.* Mechanical stretch-induced changes in cell morphology and mRNA expression of tendon/ligament-associated genes in rat bone-marrow mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cell Biomech*, 2010, 7(3): 165.
- [22] 黄桂玲,邓宇.碱性成纤维细胞生长因子对骨髓间充质干细胞扩增及分化潜能的影响[J].*中华实验外科杂志*, 2012, 29(11): 2 274.
- [23] Yuan S, Pan Q, Fu CJ, *et al.* Effect of growth factors (BMP-4/7&bFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Indian J Med Res*, 2013, 138(1): 104.
- [24] 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): 1 819.
- [25] 蒋柳宏,郑有华,张志光,等.bFGF基因转染对兔骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J].*中山大学学报*, 2009, 30(4): 41.
- [26] Lin WP, Chen XW, Zhang LQ, *et al.* Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63 444.
- [27] Wei LL, Gao K, Liu PQ, *et al.* Mesenchymal stem cells from Chinese Guizhou minipig by hTERT gene transfection[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(2): 547.

(收稿日期:2013-12-16 修回日期:2014-01-08)