

骨髓基质细胞成骨作用研究进展

李楠 王和鸣

1867 年,德国病理学家 Cohnheim 在研究伤口愈合过程时,提出骨髓中有骨髓基质细胞(Marrow Stromal Cell, MSC)存在的观点。1974 年 Friedenstein 等^[1]发现,骨髓标本中小部分贴附细胞在培养过程中能够分化形成类似骨或软骨的集落。1988 年 Mamiatopoulos 等^[2]首次报道鼠骨髓基质细胞在体外培养能形成钙化的骨样组织,经 X 线衍射分析确定形成的钙化物具有羟基磷灰石结构,证明体外培养骨髓基质具有成骨能力。Benakyahu 等^[3]将骨髓基质细胞体外培养获得具有典型的成骨细胞(OB)特性的细胞:①具有较高的 ALP 活性;②只产生 I 型胶原;③在条件培养液中可以产生矿化的细胞外基质。骨髓基质中的这种多能细胞因其自身所具有的特殊性而日益受到人们的关注。首先,它是具有多向分化潜能的原始骨髓细胞,在特定的条件下可向成骨细胞、成软骨细胞、细胞腱、脂肪细胞、血管内皮细胞及神经星状细胞等分化^[4];其次,骨髓基质细胞独特的细胞增殖分裂模式使外源基因易于导入和表达^[5]。因此,骨髓基质细胞是潜在的基因治疗靶细胞。

一、骨髓基质细胞与骨重建

骨髓基质是指骨髓腔内为造血系统提供结构及功能支持的结缔组织,其成骨潜能来源于基质系统的基质细胞。骨重建是指从微观上对成熟骨的更新,使骨骼一直保持着完整的结构,以保证在发育成熟的漫长生命过程中骨骼在微观结构上能够适应功能的需要。骨重建贯穿整个生命过程。骨髓基质细胞的存在为骨重建的过程提供了潜在的支持。现已证实^[6]:骨髓基质细胞中包含有两种类型的骨祖细胞:①定向性骨祖细胞(Determined osteogenic precursor cell, DOPC),具有干细胞的特性,不需外源性诱导物的作用能自动分化成骨,它仅在骨髓中及骨表面发现,由骨髓基质干细胞转化而成;②诱导性骨祖细胞(Inducible osteogenic precursro cell, IOPC),是一

种未分化的间叶细胞,存在于所有的结缔组织中,也存在于骨髓中,这些细胞并不能自发地形成骨组织,必须在骨形态发生蛋白(BMP)等诱导物质的作用下才能转化为成骨细胞系^[7]。骨髓基质细胞是唯一含有丰富的定向性骨祖细胞和诱导性骨祖细胞的组织^[8]。细胞生物学原理显示细胞的数量及密度对其增殖和分化特性会产生很大的影响。通过体外细胞培养的方法将骨髓基质细胞自骨髓中分离出来,进一步在体外培养条件下研究其增殖及生长特性,对于研究骨髓基质细胞与骨重建之间的关系和探讨运用骨髓基质细胞为材料进行体外培养来建立定向成骨细胞转化体外培养模型的可能性都具有重要的理论和实际意义。

二、骨髓基质细胞的生理功能

细胞的增殖和分化是细胞生命进化过程中所获得的两个基本生物学属性,细胞因此存在着两种状态,即增殖态和功能态。增殖态是指细胞进行细胞质和细胞核的复制,继而发生有丝分裂,将细胞质和细胞核进行平均分配,细胞由一变二,细胞数量得以增加。功能态是指细胞在分化基础上完成特定功能活动如分泌、传导、吞噬等^[9]。一般认为骨髓基质细胞向成骨细胞转化在骨形成过程中可划分为分化期、增殖期、矿化期和休止期四个阶段:①在分化早期碱性磷酸酶(ALP)的表达是成骨细胞分化的主要特征之一,增殖下调可提前诱导 ALPmRNA 表达;②ALP 的高峰表达发生在增殖期,为矿化期磷酸盐的聚集提供有利条件:I 型胶原的合成在细胞增殖期占主导地位;③骨钙素 mRNA 的转录和蛋白合成标志着成骨细胞进入矿化期。一般认为增殖态和功能态是细胞相对立的两种状态,以增殖态为主的细胞其功能低下,以功能态为主的细胞其增殖能力弱。对体外培养骨髓基质细胞生物学行为的研究包括对骨髓基质细胞增殖态和功能态两个方面的研究。

目前,骨髓基质细胞分化为不同类型细胞的机制尚不清楚,但是对骨髓基质细胞在体外的分离和扩增的研究,提供了探讨细胞定向分化机制的可能。

从不同的分化条件分析,基础营养、细胞密度、空间组织、机械力、生长因子对骨髓基质细胞的分化都有很大的影响。骨髓基质细胞具有自我复制能力,并且可以经过不可逆的终末分化过程产生子代细胞,可以通过各种子代细胞、前体细胞的分化谱系产生多种细胞表现型的表达。成年人骨髓中存在一定数目的骨髓基质细胞,能够通过分化形成多种中胚层组织,包括骨和软骨组织、肌腱、肌肉、脂肪细胞以及骨髓基质结缔组织等。已有报道通过使骨髓基质细胞进入成骨细胞或软骨细胞分化谱系的方法来修复骨组织、关节软骨组织的缺损^[10]。目前,骨髓基质细胞已被作为组织工程化骨组织中成骨细胞来源的选择,组织工程方法应用于临床已成为骨缺损修复的趋势所在。组织工程中的种子细胞来源于骨、骨外膜、骨髓、骨髓组织,其中,骨髓有取材方便,损伤小,植入机体后能适应受区的环境并保持成骨活性等优点^[11]。临床上运用骨髓治疗骨缺损、骨不连已取得良好效果。

三、骨髓基质细胞的体外培养及分化条件

大量实验表明,骨髓中骨形成细胞即骨祖细胞属基质性,而且能和造血细胞分离开来,并能在体外培养过程中转化为成骨细胞。骨髓成骨细胞培养法主要有全骨髓法和离心法。用骨髓基质细胞进行体外培养,基质细胞呈贴壁生长,并形成细胞集落,经换液或传代,无粘附性的杂细胞(如巨噬细胞、脂肪细胞等随着培养时间延长而老化)被清除,基质细胞得以纯化而继续培养,在条件培养液中可以人为地促进其成骨^[12,13]。刺激骨髓基质细胞分化的条件及物质仍在探索中,一般认为性激素、生长激素及骨折后局部释放的生物活性物质可促进骨祖细胞向成骨细胞分化。最新体外培养实验证明:①地塞米松不仅能促进成骨细胞分化成熟,诱导成骨、而且具有调节成骨样细胞合成胰岛素样生长因子和促进胶原合成的作用,刺激其碱性磷酸酶活性,但可抑制骨髓基质细胞的增殖;② β -甘油磷酸钠提供磷酸根作为 ALP 作用的底物,诱导和激活 ALP,加速钙盐沉着;③异黄酮可以增加结节的形成,促进结节矿化,刺激骨钙素的分泌,但其作用目前还有争议;④异丁黄嘌呤及 VitC 可使基质细胞的 ALP 活性稳定在较高水平;⑤骨髓基质细胞中存在 VitD₃ 受体基因,1,25(OH)₂ VitD₃ 可促进骨髓基质细胞的增殖。⑥骨形态发生蛋白、 β 转化生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、降钙素等蛋白多肽能有效刺激基质干细胞向成骨细胞系分化,并促进其增殖、

钙化成骨^[14,15]。然而,体外培养获得的骨髓基质细胞集落是由多种细胞群体组成,即基质干细胞和各种祖细胞,具有多种分化潜能,可向成骨细胞系、成纤维细胞系、成肌细胞系或成脂肪细胞系等多个方向分化,因此骨髓基质细胞中只有一部分是能自发地分化为成骨细胞的骨祖细胞,其在体外的分化很大程度上依赖于培养条件。目前对骨髓基质细胞的优化定向分化条件以及分化的分子机制研究将是急需解决的主要问题,并且体外培养的骨髓基质的前成骨细胞纯度、数量仍需提高。

四、骨髓基质细胞的转归

通过体内外培养骨髓基质细胞证实了骨髓成骨的细胞学基础是骨髓基质细胞中含有向成骨细胞转化的骨祖细胞及基质干细胞。因此骨髓基质细胞是骨代谢过程中的重要组成部分。骨髓基质细胞的增殖是成骨活动维持正常代谢的前提。而目前大部分学者对骨骼系统细胞的代谢活动均着眼于成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞的增殖、分化及功能表达,尚无学者考虑到骨髓基质细胞最后的转归,即凋亡对骨代谢性疾病的影响。细胞凋亡是生物界普遍存在而又受体内多种因素影响的生理现象。Kawakam 等^[16]发现在人的成骨细胞系及人的原代培养成骨细胞表达 Fas 抗原,Fas 的结构表明它属于肿瘤坏死因子(TNF)和神经生长因子(NGF)受体家族,Fas 与其配基结合后可诱导细胞凋亡。Kimble 等^[17]实验证实给切除卵巢大鼠阻断 TNF- α 可以完全防止骨质丢失。目前已阐明 TNF- α 能介导广泛的生物学作用,包括细胞的增殖、分化及多种细胞凋亡的效应。研究 TNF- α 介导的骨髓基质细胞凋亡的特点,对探讨骨代谢性疾病的发病机理,重新认识骨髓基质细胞在其发展中应有的作用与地位,并为骨关节代谢性疾病的防治提供新的途径具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Friedenstien AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hemato*, 1974, 2: 83-92.
- 2 Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*, 1988, 254: 317.
- 3 Benayahu D, Kletter Y, Zipori D, et al. Bone marrow derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype *in vitro* and osteogenic capacity *in vivo*. *J Cell Physiol*, 1989, 140: 1.
- 4 Pittenger MF, Machay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science*, 1999, 284: 143.

(下转第 66 页)

骨代谢的不同变化,继而引起骨量丢失速率的差异。随着年龄的老化,骨形成和骨吸收呈负平衡,骨量逐渐减少,导致所谓老年性骨质疏松症,骨质疏松症与年龄呈正相关。

3. 绝经对妇女骨量的影响

骨是雌激素的主要靶器官之一,雌激素浓度的改变将对成骨和/或破骨活动产生重大影响。已有研究证实,雌激素可刺激成骨细胞,增加骨形成及钙盐沉积,同时可抑制破骨细胞活性,减少骨量的丢失^[5]。当妇女进入更年期,卵巢功能会逐渐衰退,妇女绝经后体内雌激素水平骤然下降,使骨形成减少(可达 15%),骨吸收相对增多(可达 20%),从而使骨量迅速减少。本组资料表明,绝经前妇女的骨密度虽有随年龄增加而丢失的倾向,但丢失的速度缓慢,绝经后才明显的丢失,特别是绝经 1~3 年后更明显,绝经时间越长丢失越严重,绝经超过 15 年后骨量丢失的趋势明显减缓。目前尚无相关的权威研究来解释这种现象,估计与此时体内雌激素已下降到一相对恒定的水平有关。关于骨密度与绝经年限的相关性,林守清等^[6]报道为非线性关系(观察例数 253),将骨量的丢失分成快速丢失、稳定和再丢失 3 个阶段;谢忠建等^[7]报道为典型负相关(观察例

数 272),而本组资料显示整体上呈非线性关系,但绝经 1~15 年骨量的丢失呈明显负相关($r = 0.865$, $P < 0.05$)。因此,对于 50 岁以上的女性人群,应重视对骨质流失的预防保健,提倡有意识的补充钙质和 VitD 等,对绝经后女性,在无禁忌症的情况下还可适当补充雌激素,以延缓骨矿物的丢失,降低骨质疏松症的发病率。

参 考 文 献

- 1 刘忠厚. 骨质疏松症的诊断、预防及治疗. 中国中西医结合杂志, 1996, 16: 263.
- 2 杨定焯, 张纪淮, 李秀钧, 主编. 骨密度测定及临床应用. 成都. 四川辞书出版社, 1992. 95-100.
- 3 区品中, 唐华. 应用双能量骨量密度仪做骨密度与骨质疏松骨折关系的研究. 中华骨科杂志, 1995, 15: 260-262.
- 4 吴青, 刘晓玲, 陶国枢, 等. 骨密度随年龄变化特点及某些相关因素分析. 中华老年医学杂志, 1994, 6: 323.
- 5 柴本甫. 绝经后期骨质疏松症的病理生理及治疗. 中华骨科杂志, 1984, 4: 58.
- 6 林守清, 张涛, 何方方, 等. 绝经后骨密度改变及其临床意义. 生殖医学杂志, 1993, 2: 17-22.
- 7 谢中建, 廖二元, 伍汉文. 绝经前后妇女的骨矿物质含量分析. 中华内分泌代谢杂志, 1993, 2: 184.

(收稿日期: 2002-09-27)