

doi: 10.3969/j.issn.1009-0002.2013.03.033

综 述

人脐带间充质干细胞研究进展及应用前景

张亚斌¹, 解莉楠²

1. 天津市脐带血造血干细胞库, 天津 300384; 2. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

[摘要] 人脐带间充质干细胞(hUCMSC)是来源于发育早期中胚层和外胚层、存在于脐带沃顿胶和血管周围组织中的一类具有自我更新、增殖和多向分化潜能的干细胞。当前主要通过分离、扩增传代培养,然后超低温保存的方法提取保存hUCMSC。与其他来源的干细胞相比,hUCMSC具有来源广泛、可塑性强、对供者无不利影响、无伦理争论限制等优势,并且具有很强的向多组织分化的潜能,因此hUCMSC成为在组织工程、造血干细胞移植及基因治疗等研究领域具有巨大潜力的种子细胞,在临床应用方面有十分广阔的前景。

[关键词] 人;脐带;间充质干细胞

[中图分类号] Q25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-0002(2013)03-0437-04

Research Progress and Prospect of Application of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

ZHANG Ya-Bin^{1*}, XIE Li-Nan²

1. Tianjin Cord Blood Bank, Tianjin 300384;

2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040; China

*Corresponding author, E-mail: zhangyabin_0225@163.com

[Abstract] Human umbilical cord mesenchymal stem cells(hUCMSC), which originate from mesoderm and ectoderm at the early stage of embryonic development and inhabit the area of Wharton-jelly and perivascular tissue of umbilical cord, have been classified as a self-renewal, proliferating and multi-potential differentiating cell line. According to current technique level, hUCMSC are preserved by means of cryopreservation following enzyme-digestion, separation, and subcultural amplification. Being superior to stem cells from other sources, hUCMSC benefit an abundant source, relatively higher plasticity while less ethical controversy, no adverse affection to donors during harvest and naturally the multiple-differentiation potential like other stem cell families. Consequently, the stem cell family of hUCMSC has become a clinic prospective candidate in field of tissue engineering, hematopoietic stem cell transplantation and genetic therapy.

[Key words] human; umbilical cord; mesenchymal stem cells

胚胎干细胞的研究已被列为20世纪90年代世界十大科技成就之首,因此干细胞的研究包括间充质干细胞的研究已成为最具发展前景的领域之一。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是干细胞家族的重要成员,其在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能^[1-2],为临床治疗各种疾病,如神经系统疾病、肾病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤等提供了新的途径。

依据其来源,间充质干细胞主要包括骨髓间充质干细胞(bone marrow derived MSC, BMSC)、脂肪

间充质干细胞(adipose derived MSC, ADMSC)和脐带间充质干细胞(umbilical cord MSC, UCMSC)^[3-4]等。目前研究最为深入广泛的是BMSC,但随着供体年龄的增长及身体健康状况的差异,BMSC在数量、扩增及分化能力上出现明显下降趋势,且骨髓提取操作及过程中存在病毒、细菌感染的可能,使其研究和应用受到一定限制。与BMSC相比,采自医疗废弃物新生儿脐带的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord MSC, hUCMSC),具有来源丰富、成本低、对捐献者无损害及不涉及伦理问题等优势,因而成为未来干细胞在医疗应用上更具有潜力的理想选择^[5]。对hUCMSC的最适培养条件、最为特征性的表面标志及其诱导分化能力等的深入研究,将为其建库、扩增、移植和基因治疗提供新的理论和技术保证。

收稿日期:2012-11-02

作者简介:张亚斌(1984-),男,学士

通信作者:张亚斌,(E-mail)zhangyabin_0225@163.com

1 脐带间充质干细胞的分离及培养

1.1 脐带间充质干细胞的分离

早在2003年,俄罗斯学者Romanov^[6]和巴西学者Covas^[7]分别从脐静脉内皮和内皮下膜分离出一种间质干细胞,该细胞不含内皮组织或白血球特异性抗原,表达 α 平滑肌肌动蛋白及一些间质细胞标记。随后,Mitchell^[8]及其他多位学者^[9-10]通过实验手段证实了此类成纤维样细胞具有自我更新、增殖和多向分化潜能,并命名为人脐带间充质干细胞。

该细胞的分离方法主要有2种,即组织块贴壁法和酶消化法。组织块贴壁法操作简单,可利用间质细胞完全培养基将切成小块的脐带组织浸泡,在一定条件(5% CO₂、37℃、饱和湿度)的培养箱中分离培养,5~7 d后将贴壁生长的单个长条梭形细胞浆从组织中移出,再过5~7 d后即获得hUCMSC。酶消化法是将切成小块的脐带组织放入包含胶原酶和透明质酸酶的酶液中消化,消化时间从30 min至16 h不等^[9]。比较而言,在分离培养早期,酶消化法获得的细胞数量较大,但含有其他类型的细胞,须采用标记技术分离纯化;而贴壁法操作简单,且传代后的细胞形态及增殖活性更为稳定。也有将2种方法结合用于hUCMSC分离培养的报道。

1.2 脐带间充质干细胞的传代及扩增培养等

常用的hUCMSC培养基为低糖DMEM+或 α -MEM。刘素芳^[11]比较了4种不同培养基,发现酸性培养基Mesencult有利于脐血细胞的生长,并可形成克隆,是一种较为合适的hUCMSC培养基。在适宜培养基中培养,2~3 d须更换一次培养液,以保持细胞营养;经原代培养约2周,细胞可铺满瓶底80%~90%,此时可按1:3进行传代培养,2~3代后可得到较为纯净且均匀一致的细胞系^[12]。研究表明,传代培养的潜伏期为24~36 h,对数增长期则为4~6 d,对数生长期后将进入生长平台期^[13]。

对数期细胞按常规方法消化后可制备单细胞悬液,并可计算细胞总数。加入含高浓度胎牛血清的二甲基亚砜或甘油等冷冻保护液中。可标明细胞代数及冻存日期后进行分级冷冻,即先冻存于4℃冷藏室约40 min,转入-20℃冷冻室30~60 min,再置于-70℃的超低温冰箱中,最后将冻存管投入液氮中保存。需要使用hUCMSC时,可对细胞进行复苏操作,即在37℃环境中快速解冻,离心可去除冻存液后加入完全培养基,吹散细胞团,置培养瓶中培养。

2 脐带间充质干细胞的特征

目前虽然对间充质干细胞的研究较多,但对其

判定仍无特异性标准,主要根据形态、生长特点、免疫表型及诱导分化能力来判断。对hUCMSC的形态、生长特点、免疫标记及诱导分化能力的深入研究及总结,对hUCMSC的临床应用具有巨大作用。

2.1 形态及生长特点

分离得到hUCMSC后,培养24 h,在倒置显微镜下可观察到贴壁的形态相对均一的梭形细胞,也可见到多角形细胞^[10]。传代后的细胞为形态相对均一的梭形,呈平行排列或旋涡状排列生长。扫描电镜下观察,细胞多呈长条状纤维样,表面不光滑。细胞无明显凸起,细胞间无网络状连接。透射电镜观察显示细胞核大,呈不规则圆形或椭圆形,位于胞浆的中央,核仁明显,常染色质多,异染色质少,胞浆少,细胞器以粗面内质网和线粒体为主,胞浆内有大量游离核糖体。多次传代后,细胞的核型保持稳定。

2.2 免疫标记

hUCMSC可形成表面蛋白作为抗原标记,4~8代的hUCMSC表面标志较为稳定^[14],可表达CD10、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166及MHC I等细胞标志^[15-16],低量表达移植相关的表面标志CD80、CD86和HLA-ABC,不表达CD14、CD31、CD33、CD34、CD45、CD56及HLA II类分子,也不表达共刺激分子,可以逃逸异体的T淋巴细胞和NK细胞的识别而在异体甚至异种体内长期存活。第8代hUCMSC只有少量表达SH2、CD49e^[15]。Hochedlinger等^[17]检测示OCT-4 mRNA表达阳性。OCT-4是胚胎干细胞特异性基因,对维持干细胞未分化状态具有重要作用,表明hUCMSC具有干细胞特性。这些特性为它们作为组织工程的种子细胞提供了强大的理论根据,为自身免疫性疾病、器官移植及各种替代治疗方面的潜在应用价值提供了有力的支持。

2.3 诱导分化潜能

体内外实验显示hUCMSC具有强大的多向组织分化能力,可向外胚层、内胚层和中胚层细胞分化。体内研究发现可分化为神经细胞、内皮细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、多巴胺能神经元细胞、光敏感感受神经细胞等^[18];体外诱导还可分化为脂肪细胞、成软骨细胞、成骨细胞、神经胶质细胞、肝细胞、胰岛样细胞、平滑肌细胞、生殖细胞等^[19-22]。这使得hUCMSC在临床适用的选择范围要远远宽于造血干细胞。

诱导hUCMSC向多巴胺神经元转化实验表明酪氨酸羟化酶(TH)阳性标志率为12.7%,培养基中有多巴胺释放^[20]。hUCMSC向成骨细胞诱导发现ALP活性增高,表达骨涎蛋白,有明显的钙沉积并形成钙结节,表明其具有成骨细胞潜能^[23-24]。Kadner等分别采用来自脐动脉、脐静脉和全部脐带的细胞进行体外培养,发现3种来源的细胞均具有肌成纤维细胞

活性^[25]。Baksh等发现hUCMSC向脂肪细胞诱导时可产生丰富的脂肪小滴^[26]。

但是,不同的分离方法和诱导体系有时会产生不同的诱导分化结果。Wang等证明来源于沃顿胶的hUCMSC可诱导分化为神经细胞,而Sarugaser等报道脐带血管周围组织的细胞无法诱导分化产生神经细胞;Lee^[27]和Reyes^[28]分别用诱导神经分化的诱导体系和EGF、PDGF-BB诱导体系诱导hUCMSC,后者可见少突胶质细胞标志(MBP)阳性,而前者为阴性。因此,对于hUCMSC的诱导分化还须深入地研究,以为实际临床应用提供可靠依据。

3 脐带间充质干细胞的应用前景

如前所述,hUCMSC具有许多优良的生物学特性,与其他来源的间充质干细胞相比,hUCMSC的应用前景更为广泛(表1)。多项研究证明hUCMSC在心脑疾病^[29]、神经系统疾病^[30]、免疫疾病^[31]等的治疗中有广阔的应用前景。

3.1 心脑疾病

已有研究表明BMSC改善心脑功能的机制主要在于可分泌sDF-1和VEGF等局部细胞因子,这些因子可诱导微血管的生成,进而改善缺血组织微环境^[33]。而hUCMSC同样可表达sDF-1和VEGF因子,这一发现表明hUCMSC具有治疗心脑血管和脊髓损伤的可能。

有研究者从脐动脉、脐静脉和全部脐带中分离了3组细胞进行体外培养,发现3种细胞均是良好的心血管组织工程自体细胞源。3组细胞均为肌纤维母细胞样形态,表达ASMA和中间丝波形蛋白,接种聚合物有良好的组织和细胞外基质结构,含胶原蛋白I、III和弹力蛋白。外源性hUCMSC对脑组织的修复机理可能涉及到诱导内源性VEGF表达、局部微血管增生、抑制细胞凋亡等。

3.2 神经疾病

研究显示,间充质干细胞除了可分化为各种间叶组织的细胞外,也可产生非间叶组织的细胞如神经细胞。因此间充质干细胞也可能被用于治疗帕金森病、老年性痴呆等神经系统疾病。

在神经肌肉系统疾病中,hUCMSC移植入卒中模型大鼠脑内可明显改善其神经功能,提高皮质神

经元活性^[34];将hUCMSC植入患帕金森病大鼠模型的单侧受损纹状体内,移植的细胞TH染色阳性^[35];将hUCMSC移植入光感受器退变老鼠的视网膜下,hUCMSC分泌的大量神经营养因子对视觉细胞的修复起很大的作用,尤其是脑源性神经营养因子,可有效地修复视觉功能^[18]。

3.3 免疫疾病

随着对间充质干细胞研究的深入,其免疫学特性引起了免疫学家和移植专家们的极大兴趣。间充质干细胞本身的低免疫原性和自身所固有的免疫抑制作用,大大扩展了其临床应用范围。因此,间充质干细胞不仅可进行自体输注,也可在不需组织配型的情况下进行异体输注。将其应用于器官移植、骨髓移植和自身免疫性疾病治疗中,可减少免疫抑制药物的应用剂量和副作用。

3.4 存在问题

尽管间充质干细胞具有种种优点,但在能够安全有效地将间充质干细胞应用于临床前,还有许多问题需要解决。一是其自身致瘤性问题,目前存在较大争议;二是免疫抑制作用持续时间长短、作用强弱,是否会增加机体感染概率、提高机体内细胞恶性病变的可能性还不明确;三是尽管体外实验表明间充质干细胞在不同细胞因子的作用下可被诱导分化为多种组织细胞,且这些由间充质干细胞诱导分化而来的细胞具有这些组织细胞的形态和表型,但具有这些组织细胞功能的报道还须进一步补充。

尽管存在以上问题,但许多体内研究已显示了它在治疗多种疑难病症中的巨大潜力。间充质干细胞的出现仍有着跨时代的意义,其已成为当代各国科学界研究的中心内容。它不仅为组织工程和细胞治疗提供了种子细胞,而且为各种疑难疾病的攻克带来了希望和曙光,必将引导世界医学新潮流,引起一场新的医学革命。

参考文献

- [1] Eggenhofer E, Steinmann J F, Renner P, et al. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts[J]. *Transplant Immunol*, 2011,24(3):157-163.
- [2] Li Lin, Tian Hui, Yue Weiming, et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo[J]. *J Cell Physiol*, 2011,226(7):1860-1867.
- [3] Charbord P, Oostendorp R, Pang Wenxin, et al. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(10):1202-1210.
- [4] Ikuo I, Tokiko N, Masaki J H, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord[J]. *Int J Hema-*

表1 不同来源间充质干细胞的生物学特性比较^[32]

来源	取材操作	细胞含量	增殖分化能力	免疫原性	伦理争议
骨髓	有创,痛苦	较低	较低,受年龄影响	较高	存在
脂肪	有创	较低	较低,受年龄影响	较高	存在
脐血	无创	极低	较强	低	无
脐带组织	无创	丰富	较强	低	无

- tol, 2009,90(2):261-269.
- [5] Wang Limin, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng A*, 2009,15(8):2259-2266.
- [6] Romanov Y A, Svintsitskaya V A, Smirnov V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2003,21(1):105-110.
- [7] Covas D T, Siufi J L C, Silva A R L, et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003,36(9):1179-1183.
- [8] Mitchell K E, Weiss M L, Mitchell B M, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia[J]. *Stem Cells*, 2003,21(1):50-60.
- [9] Wang Hwai-Shi, Hung Shih-Chieh, Peng Shu-Tine, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2004,22(7):1330-1337.
- [10] Hou Lingling, Cao Hua, Wang Dongmei, et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro[J]. *Int J Hematol*, 2003,78(3):256-261.
- [11] 刘素芳, 鄢文海, 韩雪飞, 等. 人脐血间充质细胞体外分离培养方法及培养基特性[J]. *中国临床康复*, 2005,(46):34-35.
- [12] 袁源, 杨树源, 韩忠朝, 等. 人脐带间充质干细胞体外扩增和向神经元样细胞定向诱导分化的研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2006,(03):230-236.
- [13] 袁源, 杨树源, 韩忠朝, 等. 人脐带间充质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2006,(01):118.
- [14] Jiang Yuehua, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain[J]. *Exp Hematol(Charlottesville)*, 2002,30(8):896-904.
- [15] Weiss M L, Medicetty S, Bledsoe A R, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease [J]. *Stem Cells(Miamisburg)*, 2006,24(3):781-792.
- [16] Conconi M T, Burra P, Di Liddo R, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential[J]. *Int J Mol Med*, 2006,18(6):1089-1096.
- [17] Hochedlinger K, Yasuhiro Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. *Cell*, 2005,121(3):465-477.
- [18] Lund R D, Wang Shaomei, Lu Bin, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3):602-611.
- [19] 任红英, 赵钦军, 刘拥军, 等. 脐带间充质干细胞体外诱导分化为肝细胞样细胞的研究[J]. *山东医药*, 2008,(30):24-26.
- [20] Fu Y S, Cheng Y C, Lin M Y A, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism[J]. *Stem Cells*, 2006,24(1):115-124.
- [21] Huang Peng, Lin Li-Min, Wu Xiao-Ying, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro[J]. *J Cell Biochem*, 2010,109(4):747-754.
- [22] 侯玲玲, 曹华. 人脐血间充质干细胞体外扩增和向神经元样细胞定向诱导分化的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2002,(08):22-26.
- [23] Jo C H, Kim O S, Park E Y, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion[J]. *Cell Tissue Res*, 2008,334(3):423-433.
- [24] Cremonesi F, Violini S, Lange Consiglio A, et al. Isolation, in vitro culture and characterization of foal umbilical cord stem cells at birth[J]. *Vet Res Commun*, 2008,32:139-142.
- [25] Kadner A, Zund G, Maurus C, et al. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004,25(4):635-641.
- [26] Baksh D, Yao Raphael, Tuan R S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. *Stem Cells*, 2007,25(6):1384-1392.
- [27] Lee O K, Kuo T K, Chen Wei-Ming, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Blood*, 2004,103(5):1669-1675.
- [28] Reyes M, Verfaillie C M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001,938(1):231-235.
- [29] Chen Aiqing, Siow B, Blamire A M, et al. Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a model of perinatal brain injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010,5(3):255-266.
- [30] Lim J Y, Park S I, Kim S M, et al. Neural differentiation of brain-derived neurotrophic factor-expressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in culture via TrkB-mediated ERK and-catenin phosphorylation and following transplantation into the developing brain[J]. *Cell Transplant*, 2011,11(12):1855-1866.
- [31] Cavaglieri R C, Martini D, Sogayar M C, et al. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model[J]. *Transplant Proc*, 2009,41(3):947-951.
- [32] 陶然, 韩焱福, 柴家科. 人脐带组织间充质干细胞研究进展及应用前景[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010,(3):293-296.
- [33] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells[J]. *Circ Res*, 2004,95(4):343-353.
- [34] Ding D C, Shyu W C, Chiang M F, et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of [beta] 1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model[J]. *Neurobiol Dis*, 2007,27(3):339-353.
- [35] Weiss M L, Medicetty S, Bledsoe A R, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease [J]. *Stem Cells*, 2006,24(3):781-792.