

# 骨髓间充质干细胞诱导分化成骨细胞的研究现状

师彬<sup>1,2</sup>, 杨武斌<sup>3\*</sup>, 王平<sup>3</sup>

(1. 山东省医学科学院附属医院, 济南 250003; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102;  
3. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

**[摘要]** 归纳总结骨髓间充质干细胞的诱导方法和现代应用情况, 为骨髓间充质干细胞诱导分化成骨细胞的深入研究提供参考。通过查阅、整理有关骨髓间充质干细胞的文献资料, 从骨髓间充质干细胞的生物特性与制备、诱导成骨细胞的方法、在组织工程骨中的应用、所面临的问题以及未来的研究方向等方面进行总结和分析。结果显示骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 体外可诱导分化为成骨细胞, 采用组织工程学技术可在体外构建骨组织工程支架。基于骨髓间充质干细胞的特性, 使其在创伤修复、细胞替代治疗、支持造血、基因治疗等方面的应用前景也相当广阔。有必要开展骨髓间充质干细胞成骨诱导分化机制的研究, 为其诱导分化成骨细胞提供指导意义和借鉴价值。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 诱导分化

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0228-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190228

## Research Progress in Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts

SHI Bin<sup>1,2</sup>, YANG Wu-bin<sup>3\*</sup>, WANG Ping<sup>3</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250003, China;*  
2. *Wangjing Hospital of CACMS, Beijing 100102, China;*  
3. *Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China*)

**[收稿日期]** 20130810(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273776); 山东省科技攻关计划项目(2010GCSF10278); 2012年度山东省自主创新重大计划项目(2012ZHZX1C0405); 山东中医药科技发展计划项目(2011-154); 山东省科技发展专项(2012G0021846)

**[第一作者]** 师彬, 博士, 主任医师, 从事骨科疾病研究, E-mail: sdyky-shibin@163.com

**[通讯作者]** \* 杨武斌, 硕士, 从事药理学研究, Tel: 13255696773, E-mail: yangwubinhome@163.com

[9] LI R, YAN Z Y, LI W J, et al. The establishment of chromatographic pharmacodynamics [J]. *Edu Chin Med*, 2002, 21(2):62.

[10] 苏薇薇. 沙田柚指纹图谱特征与其药效学关系的研究 [D]. 广州: 第一军医大学, 2005:4.

[11] 卢红梅, 梁逸曾, 钱频等. 鱼腥草注射液质量控制中的谱效学初步探讨 [J]. *药学报*, 2005, 40(12):1147.

[12] 赵军宁, 鄢良春, 宋军, 等. 基于“功效-毒性-物质”的新型中药质量控制模式的思路与方法 [C]. 天津: 2010年中国药学会大会暨第十届中国药师周, 2010:11.

[13] 孙毅. 坤川楝子炮制工艺及质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2004:1.

[14] 贺福元. 中药(复方)药动学研究现状及研究方法探讨 [J]. *中草药*, 2005, 36(10):1582.

[15] 唐光曦, 黄彦珺, 张艺, 等. 黄连体外改善胰岛素抵抗活性与 HPLC 指纹图谱的相关性研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2009, 11(6):828.

[16] 王微. 黄芩指纹图谱及谱效关系研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009:71.

[17] 丁洪涛. 姜黄挥发油组效关系研究 [D]. 天津: 天津大学, 2012:48.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ]** The aim of this study was to summarize the processing induced osteogenic differentiation and modern applications of bone marrow mesenchymal stem cells so as to provide a reference for its further study. By referring to the relevant literatures, the processing research of bone marrow mesenchymal stem cells was summarized and analyzed. The review mainly focused on the biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, induced osteogenic differentiation, the application of tissue engineering bone, the problems of bone marrow mesenchymal stem cells at present and the research direction in the future. It has been revealed that bone marrow mesenchymal stem cells have the multi-potential of differentiation and can be induced to differentiate into osteogenic ex vivo. Bone marrow mesenchymal stem cells can be used for wound healing, cell replacement therapy, hematopoiesis and gene therapy due to their characteristics. Understanding the mechanisms of induction and differentiation will be of important value to the research method of differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts.

**[ Key words ]** bone mesenchymal stem cells; osteoblast cells; osteogenic differentiation

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种多潜能干细胞,可分化为多种组织细胞,其免疫原性弱,而且易于转染外源基因,是组织工程研究的热点载体细胞,在基因治疗及细胞治疗领域也展示了光明的前景<sup>[1-2]</sup>。BMSCs作为基因治疗的理想靶细胞,具有高代谢活力、利于重组蛋白分泌等诸多生物学特性,在不同诱导条件下具有多向分化潜能,体外扩增能力强。为促进BMSCs持续向成骨细胞转化,必须保持其外界有成骨诱导剂的持续作用。目前被广泛用于细胞及组织多种疾病的替代治疗。但随着对BMSCs的研究的不断深入,发现BMSCs的数量及增殖、分化潜能随年龄的增大而不断下降,限制了自体BMSCs移植的广泛应用。因此寻找新的间充质干细胞来源是近年来国内外干细胞研究的热点之一<sup>[3]</sup>。

### 1 BMSCs生物学特性

BMSCs来源于骨髓基质,具有间充质、内皮细胞的特点,能够表达多种抗原,包括黏附因子、生长因子、许多受体和整合素,但不会表达其特异性抗原<sup>[4-5]</sup>。BMSCs起着支持和营养造血细胞的作用,是一种具有高度自我复制、多谱系分化潜能的非造血细胞来源的原始细胞亚群。其成骨潜能来源于基质系统的BMSCs。BMSCs具有强大的增殖能力和多向分化潜能,在骨代谢中扮演着重要角色,有较强的成骨潜能并保持对骨坏死修复能力,在适宜的体内或体外环境下可被诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、基质细胞和造血细胞等多种细胞,是目前最理想的骨组织工程研究领域的理想种子细胞<sup>[6-7]</sup>。而且BMSCs易于接受外源基因的导入,在造血重建、组织修复和基因治疗方面也具有广阔的应用前景,是极具潜力的基因治疗载体细胞<sup>[8]</sup>。

目前,常用的BMSCs分离纯化的方法有全骨髓贴壁培养法和密度梯度离心法。而BMSCs的鉴定主要借助其表面抗原性,BMSCs在细胞贴壁附着后表达CD29,CD44等多种表面蛋白,但不表达造血干细胞表面标志CD14和CD34等<sup>[9]</sup>。这些表面抗原在免疫学上很特别,低表达主要组织相容性复合体MHC I和MHC II,不表达主要共刺激分子如CD40,CD80,CD86。从而同种异体移植BMSCs并不引

起排斥反应<sup>[10]</sup>。因此,BMSCs日益受到人们的关注,并成为基因治疗、细胞治疗及组织工程学等相关研究的主要种子细胞,具有良好的应用前景。

### 2 诱导骨髓间充质干细胞向骨细胞分化的诱导方法

**2.1 自体富血小板血浆** 自体富血小板血浆(APRP)是从自体血中提取的血小板浓缩液,经凝血酶激活后形成的胶状物。用APRP替代异种血清进行BMSCs的培养,可诱导BMSCs向成骨分化。有研究表明将APRP替代胎牛血清(FBS),用于BMSCs体外培养扩增,发现APRP能有效促进干细胞增殖并启动干细胞成骨分化过程<sup>[11-12]</sup>。

王善正等<sup>[13]</sup>通过用APRP在体外培养兔的BMSCs。结果发现经自体激活富血小板血浆诱导的BMSCs II型胶原 $\alpha_1$ 链基因和聚集蛋白聚糖基因表达明显增高,可见自体激活富血小板血浆具有促进兔BMSCs向软骨细胞方向分化的潜能。陈涛等<sup>[14]</sup>将覆盖于犬脱钙骨基质/富血小板血浆/骨髓间充质干细胞后植入犬背阔肌下,诱导其向成骨细胞分化其成骨效果明显,可构建出较理想的组织工程骨。

**2.2 中药提取物** 中药及其有效成分对于BMSCs向成骨细胞增殖和分化有促进作用,通过体外培养BMSCs诱导其向成骨细胞方向分化,可以促进骨损伤的修复。

武密山等<sup>[15]</sup>采用川续断皂苷VI(akebia saponin D)对大鼠BMSCs定向诱导分化为成骨细胞的影响,发现川续断皂苷VI具有促进大鼠体外BMSCs向成骨细胞增殖和分化的作用,这一作用可能与其升高Cbf $\alpha_1$  mRNA的表达有关。顾巧丽等<sup>[16]</sup>采用不同浓度姜黄素对大鼠BMSCs成骨分化的诱导,发现姜黄素呈剂量依赖性促进BMSCs碱性磷酸酶活性及Runx-2、血红素单加氧酶1的表达,证明姜黄素能有效促进大鼠BMSCs早期成骨分化。杨渊等<sup>[17]</sup>用柚皮苷诱导兔BMSCs向成骨力方向分化,结果柚皮苷成功的诱导了BMSCs向成骨方向的分化,并且基质分泌增多,形成钙结节,无明显毒性作用。

**2.3 其他诱导剂** BMSCs经成骨诱导后,碱性磷酸酶(ALP)和钙化结节是BMSCs向成骨细胞分化成熟的重要标志。阿仑膦酸钠(ALN)是一种高效的骨吸收抑制剂。余国

荣等<sup>[18]</sup>采用 ALN 对 BMSCs 进行诱导,以分化过程中 ALP 和钙化结节的表达为指标,观察发现 ALN 能促进 BMSCs 增殖和骨向分化。

雷奈酸锶主要是用于治疗 and 预防绝经后妇女的骨质疏松的。有研究发现 Sr 可通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路促进大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化<sup>[19]</sup>。吕辉珍等<sup>[20]</sup>发现骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)/Smad 通路参与了 Sr 促进 BMSCs 成骨分化。

激素也可以诱导 BMSCs 向成骨细胞分化。韩娜等<sup>[21]</sup>观察发现 17 $\beta$ -雌二醇可诱导 BMSCs 向成骨细胞转化,其可能通过上调 Runx2 因子表达发挥促成骨作用。吕玉明等<sup>[22-23]</sup>采用地塞米松、 $\beta$ -磷酸甘油和维生素 C 3 种物质作为诱导 BMSCs 向成骨细胞分化的基本辅剂,所培养的细胞具有典型的成骨细胞形态和功能。因此 BMSCs 经过成骨诱导剂的诱导后能够表现出成骨细胞的形态学和生物学特性。

### 3 BMSCs 在骨组织工程中的应用

**3.1 修复软骨损伤和骨缺损** 随着干细胞技术的发展,利用 BMSCs 联合组织工程技术修复软骨损伤成为一种可能。利用细胞片层技术结合 BMSCs 可以构建出含板层骨结构的组织工程骨,可修复下颌骨缺损<sup>[24]</sup>。如在颞下颌关节紊乱病患者中采用软骨的组织工程技术,通过高浓度软骨细胞的关节腔内注射,利用软骨细胞的可流动性复合到关节内关节创面,经细胞的增殖及分泌功能产生正常的胶原纤维修复病变的关节盘及关节面,从而全面恢复关节的功能,从而达到根治疾病的目的<sup>[25]</sup>。还有,BMSCs 复合载异补骨脂素作为一种新型复合材料具有明显骨诱导作用,可望成为临床应用中修复颌骨缺损的新型材料<sup>[26]</sup>。

杨兴华等<sup>[27]</sup>通过体外培养骨髓间充质干细胞,注入兔颞下颌关节紊乱病动物模型,发现骨髓间充质诱导的成软骨细胞关节腔注入后可促进兔颞下颌关节骨关节病愈合。张亮等<sup>[28]</sup>应用 BMSCs 联合纤维蛋白胶 (FG) 较好地修复了大鼠牙槽骨缺损,发现其是修复小范围骨缺损理想的种子细胞与支架材料。也有报道利用自体微小颗粒骨复合骨髓间充质干细胞治疗感染性骨缺损,显示出良好的效果<sup>[29]</sup>。

**3.2 股骨头坏死** 股骨头坏死 (ONFH) 是一种常见病、多发病,股骨头坏死患者的保头治疗是困扰国内外骨科医生的难题。研究表明,非创伤性 ONFH 可能与股骨头内含有成骨始祖细胞的 BMSCs 数量减少和增殖能力减弱有关<sup>[30-31]</sup>。

庞承刚等<sup>[32]</sup>通过研究仿生脉冲磁场 (BEMF) 联合同种异体 BMSCs 对兔早期股骨头坏死 (ONFH) 模型的促血管再生、骨再生的修复作用,发现 BEMF 联合同种异体 BMSCs 移植可促进坏死股骨头内血管再生和骨修复作用。冯建书等<sup>[33]</sup>探讨自体松质骨和 BMSCs 联合移植治疗股骨头缺血性坏死的可能机制,为该方法应用于临床提供依据。BMSCs 治疗股骨头缺血性坏死,主要是细胞移植能为股骨头的骨质修复提供了充足的 BMSCs,从而骨修复现象活跃,提高了骨移植的成功率,促进股骨头骨组织修复。

### 4 讨论与展望

BMSCs 有广泛的多分化潜能,可通过化学药物、物理刺激、生物因子等诱导其分化<sup>[34]</sup>。具有来源丰富、病原微生物感染率低,且生物性能稳定、低免疫原性和负性免疫调节作用,同种异体移植免疫排斥反应弱,不产生移植抗宿主病等诸多优点,是细胞移植治疗和工程器官构建理想的种子细胞,为组织再生修复与原位重建提供了新思路。但是直到目前为止 BMSCs 在体内的细胞生物学和分子生物学作用机制尚不清楚,BMSCs 广泛应用于临床还有许多问题亟待解决。未来可通过基因工程方法将具有成骨作用的基因导入 BMSCs,使目的基因在细胞内表达并合成具有骨诱导作用的生长因子,来克服外源性生长因子在临床应用中半衰期短、需反复给药、大剂量给药有副作用等缺点<sup>[35-36]</sup>。因此它在组织工程创伤修复、细胞替代治疗、基因治疗等方面具有很好的临床应用价值和广阔的应用前景。

### [参考文献]

- [1] Koga H, Engebretsen L, Brinchmann J E, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review [J]. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, 2009, 17(6): 1289.
- [2] 宋鹏, 王鸣刚, 姚娟, 等. 淫羊藿苷对 rBMSCs 成骨和成脂分化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 200.
- [3] 张元中. 蜕皮甾酮对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [4] 张玉明. 大鼠骨髓间充质干细胞经 HIF-1 $\alpha$  基因转染后生物学特性的实验研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [5] 闫晓风, 叶晴杰, 刘会洋, 等. 骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化及一贯煎的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 123.
- [6] 王钊. 神经肽 CGRP、SP、NPY 对骨髓基质干细胞的生物学效应及其机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [7] 陈鹏飞, 吴小翎, 周伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞向肝样细胞的定向诱导分化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(1): 20.
- [8] 田雨, 杨燕, 江德鹏, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外向血管平滑肌样细胞诱导分化过程中 Periostin 的表达及其作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(2): 163.
- [9] 崔洁, 蒋明德, 梅浙川, 等. 电穿孔法转染增强型绿色荧光蛋白基因对人骨髓间充质干细胞生物学特性的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(7): 797.
- [10] 高振华, 胡晓书, 蔡华松, 等. SPIO 标记兔 BMSCs 的生物学特性与体外 MRI 显像研究 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2012, 10(5): 1.

- [11] 谢星. 骨髓间充质干细胞(BMSCs)治疗挤压伤性急性肾损伤(衰竭)的实验研究[D]. 福州:福建医科大学,2011.
- [12] 马志兵,袁峰,金培生,等. 不同培养方法对兔骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的影响[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(1):177.
- [13] 王善正,王宸,芮云峰,等. 自体激活富血小板血浆干预兔骨髓间充质干细胞体外成软骨分化的研究[J]. 中国组织工程研究,2013,17(1):1.
- [14] 陈涛,王艳辉,卜令学,等. 应用细胞片层技术构建组织工程骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(2):191.
- [15] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷VI诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(2):222.
- [16] 顾巧丽,蔡燕,黄晨,等. 姜黄素调控大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. 中国组织工程研究,2012,16(27):5057.
- [17] 杨渊,李小峰,罗道明,等. 柚皮甙诱导兔骨髓间充质干细胞的成骨特征[J]. 中国组织工程研究,2013,(14):2603.
- [18] 余国荣,吴昊,查振刚,等. 阿仑膦酸钠对骨髓间充质干细胞骨向诱导的实验研究[J]. 广东医学,2012,33(2):155.
- [19] 黄晓丹,吕辉珍,靳思思,等. 雷奈酸锶通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(2):302.
- [20] 吕辉珍,黄晓丹,靳思思,等. 雷奈酸锶通过骨形态发生蛋白-2/Smad 通路促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 南方医科大学学报,2013,33(3):376.
- [21] 韩娜,寇玉辉,王天兵,等. 17 $\beta$ -雌二醇对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的诱导调控[J]. 中国组织工程研究,2012,16(10):1721.
- [22] 吕玉明,程立明,裴国献,等. 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的实验研究[J]. 实用医学杂志,2012,28(9):1401.
- [23] 赵大成,汪玉良,党跃修,等. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外成骨诱导[J]. 中国组织工程研究,2012,16(14):2491.
- [24] 姚超,卜令学,王科,等. 应用细胞片层技术构建组织工程骨修复犬下颌骨缺损的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志,2012,30(3):229.
- [25] Shi J, Zhang X, Zeng X, et al. One-step articular cartilage repair: combination of in situ bone marrow stem cells with cell-free poly (L-lactic-co-glycolic acid) scaffold in a rabbit model[J]. Orthopedics, 2012,35(5):e665.
- [26] 高志超,李善昌,金珊丹,等. 骨髓间充质干细胞复合载异补骨脂素支架材料修复骨缺损的研究[J]. 口腔医学研究,2012,28(12):1234.
- [27] 杨兴华,彭琳,刘云生,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗颞下颌关节骨关节病[J]. 中国组织工程研究,2013,17(19):3488.
- [28] 张亮,丁寅,邵金陵,等. 骨髓间充质干细胞联合纤维蛋白胶修复大鼠牙槽骨缺损的研究[J]. 华西口腔医学杂志,2011,29(2):125.
- [29] 李刚,李志远,荆浩,等. 自体微小颗粒骨复合骨髓间充质干细胞治疗兔感染性骨缺损的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报,2012,34(5):462.
- [30] 王佰亮,李子荣,孙伟,等. 浓缩自体骨髓移植治疗非创伤性股骨头坏死的临床研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2011,5(4):426.
- [31] Rodrigues M T, Gomes M E, Viegas C A, et al. Tissue-engineered constructs based on SPCL scaffolds cultured with goat marrow cells: functionality in femoral defects [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011,5(1):41.
- [32] 庞承刚,姜文学,姜春乾,等. 仿生脉冲磁场联合同种异体骨髓间充质干细胞移植治疗股骨头坏死的实验研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2012,6(5):756.
- [33] 冯建书,胡永成,王保芝,等. 自体松质骨和骨髓间充质干细胞联合移植治疗家兔股骨头缺血性坏死的实验研究[J]. 中医正骨,2012,24(6):13.
- [34] 徐凌霄,高俊,张前德. 左归丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):149.
- [35] 曾昭勋. hTGF- $\beta_1$ 、hBMP-2 基因修饰骨髓间充质干细胞生物学特性的实验研究[D]. 福州:福建医科大学,2011.
- [36] 刘玲英,柴家科,韩焱福,等. 脐带 Wharton 胶来源 MSCs 生物学特性及其优越性的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志,2011,25(6):745.

[责任编辑 邹晓翠]