

· 综 述 ·

细胞生长因子诱导骨髓基质干细胞成骨的研究进展

刘道华 综述, 夏德林 审校

(泸州医学院附属口腔医院口腔颌面外科, 四川泸州 646000)

关键词: 骨髓基质干细胞; 骨形态发生蛋白; 基因修饰; 诱导成骨

中图分类号: R365.681

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)02-0244-03

骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)被认为是骨组织工程中最有应用前景的理想种子细胞^[1]。由于 BMSCs 具有分化多方向性的特点, 而骨组织工程学要求其向单一方向分化, 所以, BMSCs 的定向诱导具有重要作用。就其成骨方向来说, 常用的具有诱导作用生长因子有骨形态发生蛋白(BMP)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)等。它们不仅可单独作用, 相互之间也存在着密切的关系, 可复合使用。本文就细胞生长因子对 BMSCs 分化及增殖的诱导作用作一综述。

1 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是一组疏水性的酸性糖蛋白, 属于转换生长因子超家族。BMP 是一组具有很强骨诱导活性的生长因子, 可能是诱导骨髓基质干细胞向成骨细胞系转化的基本信号因子, 其中研究最多也是成骨活性最强的是 BMP-2 和 BMP-7。BMP-2 可明显加速 BMSCs 向成骨细胞转化, 可促进成骨细胞前体细胞向成骨细胞转化。研究表明, BMP 首先与细胞膜上的丝氨酸/苏氨酸激酶受体相结合, 形成 I、II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的二聚体, 然后将信息转导入细胞内, 经第 2 信使 MAD(mad against dpp)的磷酸化, 将信息导入细胞核内, 从而激活或调整 DNA 的结合活性, 使 BMP 活性相关的基因表达, 产生相应的生物效应。

对 BMP 的骨诱导活性人们看法比较一致, 其在体内通过募集间充质细胞, 并诱导其向成骨细胞或成软骨细胞方向分化, 同时协同其他调节因子共同参与诱导骨形成; 在体外不仅能够调节成骨细胞的转化, 对骨祖细胞以及间充质细胞均具有强烈的骨诱导活性, 而且可能使诱导性骨细胞向确定性骨细胞转化。但其对细胞增殖的影响目前尚有争论。Akino 等^[2]用 BMP-2 及 bFGF 诱导人 BMSC 发现用 BMP-2 诱导的无血清培养的 BMSC 在 2d 时细胞数目显著增多并达到平台期, 且 BMP-2 和 bFGF 有明显的协同作用二者合用可使平台期后延。用荧光激活分选术进一步表明 BMP-2 使细胞周期前移 G₂/M 期细胞比例增多。研究证实, 重组人 BMP-2(rhBMP-2)能够提高人 BMSC 及肋骨来源的成骨细胞内碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素、I 型胶原 mRNA 的表达。Boden^[3]以 LMP-1(潜在性膜蛋白-1)cDNA 转染骨髓细胞, 在脊柱融合模型中局部植入可诱导实验组 100% 脊柱融合, 而对照组未见成骨。有研究表明用地塞米松处理成纤维样的骨髓基质细胞向成骨细胞分化时表达 BMP-2, 而 ascorbic acid 作用于骨髓基质细胞时, 发现它可通过诱导 I 型胶原形成, 继而激活包括 BMPs 的信号通路, 促进骨基质细胞系 ST2 细胞的成骨性分化。用 simvastatin 作用于骨髓基质细胞可以增加 osteocalcin mRNA 的表达与碱性磷酸酶的活性, 诱导 BMP-2 的表达, 促进成

骨^[4-5]。有学者运用分子生物学技术, 将骨形态发生蛋白 2 基因转入细胞内, 在表达载体的作用下, 产生具有生物学活性的骨形态发生蛋白 2 二聚体, 并分泌到细胞外, 诱导骨髓基质干细胞向软骨细胞和成骨细胞方向分化, 促进骨组织生成^[6-9]。

2 成纤维细胞生成因子(fibroblast growth factor, FGF)

根据等电点的不同, 将其分为酸性和碱性两种, 广泛存在于脑、垂体、肝、肾、骨、软骨等多种组织细胞中, 是一种广谱的有丝分裂源, 对来源于中胚层和神经外胚层的细胞具有明显的促增殖作用, 不仅能够促进软骨及骨组织的形成, 并且是一种强烈的毛细血管形成刺激剂^[10], 也是形态发生和分化的诱导因子, 在正常生理和病理过程中参与生长发育和组织损伤修复过程。bFGF 能够促进 BMSCs 体外培养成纤维细胞集落的形成, 促进细胞的增殖, 但对 BMSCs 的转化作用仍存在不同的研究结果。有研究证实在地塞米松存在的培养环境中, bFGF 作用 6d 时可显著增加细胞增殖, 同时骨钙蛋白表达、骨矿化结节形成。BMP-2 的促转化作用不如 bFGF 明显, 两者联合应用时促 BMSCs 转化作用强于单一因子。在众多生长因子中 bFGF 对 BMSCs 具有最强的促分裂作用, 同时经 bFGF 作用的细胞植入体内表现出较强的成骨能力。

成纤维细胞生长因子 18 是新近克隆的成纤维细胞生长因子家族成员之一, 已被证实是一种发育组织重要的分泌性信号分子, 在骨骼和软骨的发育中发挥着重要的作用^[11]。有文献报道骨髓基质干细胞表面表达有 FGF 的受体, 对 FGF 有良好的反应, 体外实验也发现, 其对骨髓基质干细胞增殖和分化为成骨细胞的作用远强于 BMP-2。有实验观察到 FGF-2 在体外可以促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化增殖, FGF-2 处理骨髓基质细胞后可显著增加它们的增殖潜能以及子代细胞的数量与克隆的大小, 提高非造血前体细胞与骨髓成纤维细胞表面分化抗原与碱性磷酸酶的表达, 在加入地塞米松后可促进其进一步的成熟。

3 转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)

TGF- β 是一族具有多种功能的蛋白多肽, 相对分子质量 100~250kd, 广泛存在于人体组织中的生长因子, 以骨和血小板中含量最高, 参与人体许多组织的炎症和修复反应, 是较强的促成骨分化的因子。

体外实验表明, TGF- β 可促进骨髓间充质细胞的增殖和分化, 促进成骨和成软骨细胞的增殖, 刺激 II 型胶原、骨粘蛋白和骨桥蛋白的合成。研究发现 TGF 能够抑制 BMSCs 的增殖, 但能提高其成骨细胞 ALP 的表达, 并能减少和延迟 BMSCs 向脂肪细胞的转化。基因重组人转化生长因子 β 可以诱导 BMSCs 向成骨细胞分化和成熟。有研究表明 TGF- β_1 和 BMP 在对基质干细胞向骨细胞方向分化的作用是不同的, TGF- β_1 在基质干细胞向成骨细胞分化的早期阶段起关键作用, 而 BMP 则促进成骨前体细胞的存活和成熟。TGF- β 对 BMSC 的作用

与细胞分化程度有关,早期促进增殖晚期促进分化。TGF- β 对多种细胞具有促分化效应,是较强的促成骨分化的因子。有研究发现 TGF- β 能够抑制 BMSC 增殖,但能提高其 ALP 的表达,并能减少和延迟 BMSC 向脂肪细胞转化,从而提高 BMSC 的成骨效应。

4 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)

VEGF 是一种糖蛋白,其相对分子质量为 34~45kd,由两个相对分子质量各为 17~22kd 的不同亚单位组成的二聚体。人类 VEGF 基因位于染色体 6P12,全长 14kb,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。由于 VEGF mRNA 有不同的剪接方式,所产生的 VEGF 蛋白主要有 5 种亚型,近年来研究表明,血管内皮生长因子对中胚层细胞分化有作用,可以使骨髓基质干细胞向成骨分化。有研究发现,外源性 VEGF 能使体外培养的成骨细胞 ALP 活性及 cAMP 浓度提高 4 倍。VEGF 诱导成骨细胞迁移,增加 ALP 活性,同时成骨细胞自身合成 VEGF。PGE1, PGE2, 1,25(OH)维生素 D₃ 及 IGF2 I 能增加成骨细胞 VEGF mRNA 的表达。

通过对外源性血管内皮细胞生长因子修复鼠下颌骨缺损进行组织学观察,发现血管内皮细胞生长因子组标本内血管形成明显增加,骨组织的再生也增加,证实了局部应用血管内皮细胞生长因子能促进骨组织再生^[12]。近年来有研究证实血管内皮细胞生长因子在血管再生中起着重要作用。它通过促进血管内皮细胞的有丝分裂、血管通透性的增加及增进单核细胞的趋化性等促进血管的再生。血管内皮细胞生长因子不仅能促进血管的再生,而且能调节成骨细胞的成骨活性,使其能更好地分泌细胞外基质,从而促进成骨。

5 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF-1)

IGF-1 是由 70 个氨基酸组成的单链多肽,相对分子质量 7.7kd,由 3 个二硫键交叉连接,被认为是软骨细胞合成代谢的主要促生长因子。IGF-1 通过与 IGF-BPs (IGF-binding protein) 相互作用来调节其生物学功能。IGF-1 可刺激单层培养中人软骨细胞的增殖,且与其剂量呈正相关。Kellner 等^[13]在实验中发现 IGF-1 在体外软骨组织工程中具有显著的正面效应。而胰岛素也被证明能够与 IGF-1 的受体相结合,并产生相同的效应。他们在试验中将牛关节软骨细胞在多聚葡酸(PGA)支架上培养 7 周。结果显示体外胰岛(0.05~50mg/mL)能够促进组织工程软骨的生长速度及多聚葡酸的聚集,并能优化软骨形态,其中以 2.5mg/mL 的浓度时效应最为明显。IGF-1 与透明质酸联合应用时具有显著的促进组织工程软骨细胞生长的作用^[14]。IGF-1 与 bFGF 或 TGF- β_2 的混合物也可明显促进组织工程软骨的发生以及 II 型胶原的生长^[15]。

6 基因修饰 (gene-modified)

许多生长因子如 BMP-2、BMP-7、TGF- β 、bFGF 等不仅可通过人工基因重组产生,而且能以病毒或非病毒载体通过体外转移的方法导入 BMSC 内并有效表达,用来修复骨缺损取得了良好的效果。有学者利用腺病毒通过体外转移的方法将 BMP-2 基因导入骨髓基质细胞,然后将该骨髓细胞与脱矿骨基质复合后修复小鼠股骨缺损,术后 2 个月,24 处骨缺损中有 22 处骨性愈合^[16]。有学者比较了腺病毒、逆转录病毒、脂质体载体对转 hBMP-2 基因小鼠 MSC 修复颅骨缺损的效果差异,发现腺病毒组成骨效果最显著,脂质体组最少。研究表明将 TGF- β_1 基因的复制缺陷型病毒转入成骨细胞中,转染后成骨细胞中 TGF- β_1 mRNA 的表达仍保持在明显的上调状态,细胞

分泌合成的 TGF- β_1 较对照组高 46 倍,细胞 I 型胶原含量提高了 5 倍,将转染了 TGF- β_1 的成骨细胞植入体内可明显增加新生骨组织的数量。基因修饰干细胞,可实现 BMSC 在体外长期扩增并维持某些干细胞的多向分化潜能特性,文献证实利用端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 基因修饰的 MSC 体外连续传代培养 3 年后,仍保持良好的自我更新和多向分化潜能^[17]。利用 TERT 基因修饰的 MSCs 建立种子细胞库有可能解决目前骨组织工程临床应用中种子细胞来源的难题,但其所致永生细胞是否有致瘤性尚需进一步研究。实验采用局部基因治疗的方式,将携带有骨形态发生蛋白 2 真核表达载体导入机体特定部位的细胞内,通过实验证实其具有诱导异位成骨作用,并能有效促进兔桡骨缺损的修复^[18]。

细胞生长因子通过调节 BMSC 增殖、分化过程并改变细胞产物的合成而作用于成骨过程,随着基因技术的发展,对基因载体的研究日益受到研究者的重视。目前报道应用的基因载体有真核表达载体 cDNA 载体、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、猴空泡病毒(SV40)等。将编码特定生长因子的基因导入 BMSC,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,从而克服了外源性生长因子在体内半衰期短、需反复给药、大剂量给药有不良反应等缺点,是骨组织工程的一重要研究方向。

参考文献:

- [1] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro[J]. BMC Cell Biol, 2006, 7:14.
- [2] Akino K, Mineta T, Fukui M, et al. Bone morphogenetic protein 2 regulates proliferation of human mesenchymal stem cells[J]. Wound Repair Regen, 2003, 11(5):354.
- [3] Boden SD. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation[J]. Tissue Eng, 2000, 6(4):383.
- [4] Song C, Darg G, Jia H, et al. Simvastatin induces estrogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2003, 35(5):533.
- [5] Song C, Guo Z, Mz Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipogenic differentiation in mouse bone marrow stromal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308:458.
- [6] Jiang S, Zhang S, Langenfeld J, et al. Mycoplasma infection transforms normal lung cells and induces bone morphogenetic protein 2 expression by post-transcriptional mechanisms[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2):580.
- [7] Vogt S, Uebliacker P, Geis C, et al. Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV. G pseudotyped retroviral vector[J]. Biomaterials, 2008, 29(9):1242.
- [8] Liu HW, Chen CH, Tsai CL, et al. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis[J]. Tissue Eng, 2007, 13(5):1113.

- [9] Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, et al. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells; optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1):84.
- [10] Simons M. Integrative signaling in angiogenesis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 264(1-2):99.
- [10] Bhindi R, Brieger D, Ishii H, et al. Fibroblast growth factor 2 and the transcription factor Egr-1 localise to endothelial cell microvascular channels in human coronary artery occlusion[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(1):172.
- [11] Ohbayashi N, Shibayama M, Kuretake Y, et al. FGFI 8 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(7):870.
- [12] Yamashita T, Yoshimura K, Morita O, et al. Histological study of bone regeneration using vascular endothelial growth factor on rat mandibular bone defect[J]. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi*, 2005, 49(5):726.
- [13] Kellner K, Schulz MB, Gopferich A, et al. Insulin in Tissue Engineering of Cartilage: A Potential Model System for Growth Factor Application[J]. *J Drug Targeting*, 2001, 9(6):439.
- [14] Huang JR, Liu SL, Song WD. Stimulation of insulin-like growth factor-I to chondrogenesis of engineering cartilage tissue[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2004, 18(1):49.
- [15] Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, et al. Interaction between insulin-like growth factor-1 with other growth factors in serum depleted culture medium for human cartilage engineering[J]. *Med J Malaysia*, 2004, 59(Suppl B):7.
- [16] Blum JS, Barry MA, Mikos AG, et al. In vivo evaluation of gene therapy vectors in ex vivo-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model[J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(18):1689.
- [17] Abdallah BM, Haack-Sorensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(3):527.
- [18] Tian XB, Sun L, Yang SH, et al. Osteogenic potential of the human bone morphogenetic protein 2 gene activated nanobone putty[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(8):745.

(收稿日期:2009-05-20 修回日期:2009-07-27)

· 综 述 ·

窄带成像技术在上消化道疾病诊断中的运用

黄 刚 综述,陶小红[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院消化内科 400016)

关键词:内窥镜;窄带成像;诊断;上消化道疾病

中图分类号:R571;R573

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)02-0246-03

内镜窄带成像技术(narrow band imaging, NBI)是 21 世纪初研发出来的全新的诊断技术,使用时一般配备放大系统,又常称作窄带成像放大内镜(magnifying endoscopy combined with NBI, ME-NBI)。它的工作原理是通过滤光器过滤掉内镜氙灯光源所发出红、蓝、绿中的宽带光谱,选择 415nm、540nm 的窄带光作为照明光,415nm 的蓝光波长短,穿透黏膜表浅,血红蛋白对光波的吸收峰也位于 415nm 左右,因而有利于显像消化道黏膜表面腺管开口和表浅血管;540nm 的绿光穿透力强,对于黏膜下层的血管显示效果好,所以,窄带成像显示黏膜表面微细结构和黏膜下血管较传统的白光模式内镜(white light endoscopy, WLE)清楚,立体感更强^[1]。本文就近年来文献报道的 NBI 技术在上消化道疾病诊断中的运用作一综述。

1 食 道

1.1 胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)

GERD 中有超过一半(50%~70%)的患者在 WLE 下未见异常,这部分患者被称作非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD),因 WLE 自身构造特点的局限,目前临床对

NERD 的诊断是症状性诊断。Sharma 等^[2]通过 ME-NBI 对 GERD 研究,提出如果把乳头内毛细血管袢数目增多(OR: 5.5; 95% CI: 1.4~21.6)、血管扩张(OR: 11.3; 95% CI: 3.2~39.9)作为 GERD 的诊断条件,将有助于内镜医师对 GERD 的识别。1994 年世界胃肠病学会将反流性食管炎的内镜下食管黏膜损伤的改变分为 A、B、C、D 4 级的 Los Angeles 分级标准,已广泛被接受,作为临床诊治依据。Lee 等^[3]采用该分级标准,比较了 ME-NBI 与 WLE 下操作者对食管炎诊断分级的一致性, WLE 下对黏膜中断的认定,更多依赖操作者的经验,常常导致分级诊断结果不一致,操作者在 ME-NBI 下,诊断结果的一致性明显要高于 WLE。

1.2 Barrett 食管(Barrett's esophagus, BE) BE 是公认食道腺癌的癌前病变,其组织学特点为特殊型肠上皮化生(specialized intestinal metaplasia, SIM),疾病的演变过程可描述为 GERD→BE→异型增生→食道腺癌,食管腺癌发病率逐年升高, BE 受到国内外学者的广泛关注。近年来,通过 NBI 技术研究上消化道病变,也以 BE 的文献报道最多。

[△] 通讯作者, E-mail: xiaohongtao@hotmail.com。