·专家述评·

低氧微环境对间充质干细胞增殖、分化影响的研究进展

李　宁

（第三军医大学新桥医院高压氧治疗中心，重庆 400037）

中图分类号：R457.7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671-8348(2010)08-0897-02

李　宁

间充质干细胞（MSCs）是一类具有自我更新能力和能够产生高度分化的功能细胞，例如骨髓间充质干细胞在适宜的体内或体外环境下不仅可分化为中胚层来源造血细胞、成骨细胞和软骨细胞，还可分化为内胚层来源的肝细胞和外胚层来源的神经组织细胞。有关间充质干细胞的研究受到国内外学者的广泛关注。其中，干细胞的增殖与分化一直是研究的重点，氧作为生命活动所必须环境因素，对MSCs的增殖、分化具有重要的调节作用。本文综述了近年来国内外报道的低氧微环境对MSCs的增殖、分化的影响及相关机制。

1　低氧微环境对MSCs增殖的影响

MSCs主要来源于骨髓，骨髓是一典型的低氧环境。体外实验证实，低氧可抑制MSCs分化而有利于增殖。D′Ippolito等[1]将骨髓来源的MSCs于3%的氧浓度下培养3 d后，结果细胞总数比21%氧浓度下培养7 d还多3倍。Grayson等[2]将人来源的MSCs于2%的氧浓度环境条件下在三维支架中培养1个月，与20%的氧浓度环境相比，在初期低氧条件下MSCs处于增殖停滞期来适应低氧条件，然而在随后的培养期间一直处于高增殖状态，集落形成能力显著增高，且干细胞标志性基因表达水平更高。Bosch等[3]分离培养猪MSCs，同样发现在低氧条件下其增殖能力增强。另有实验表明，低氧培养条件下MIAMI（marrow isolated adultmultilineage in ducible）细胞的转录因子OCT-4（otcamer4）、REX-1（reduced expression 1）、SSEA-4（stage-specific embryonic antigen 4）mRNA的表达比常氧下高，端粒逆转录酶的活性增加[4]。这些研究者推测，低氧是保持干/祖细胞未分化状态的重要因素，可促进这类细胞增殖而保持多能性，MSCs在低氧环境中能维持自我更新的能力，而在处于高氧环境时，才倾向于分化。此外，标准的培养技术最初用来培养纤维母细胞，而对其他细胞有应激损伤作用。MSCs在体内处于低氧环境中，因而对高氧应激敏感，在21%的氧浓度下培养的细胞比5%的氧浓度下培养的细胞产生更多的氧化产物，对生长不利[5]。由此认为，用于移植的MSCs适于在合适的低氧微环境中培养扩增。

2　低氧微环境对MSCs分化的影响

2.1　低氧对MSCs向软骨细胞分化的影响　体内软骨处于一种氧浓度低于平均水平的微环境，低氧对维持软骨细胞的新陈代谢具有重要意义。同样，低氧微环境对离体MSCs向软骨细胞分化也具有重要调节作用。Kanichai等[6]研究表明，在氧浓度为2%时，大鼠MSCs暴露于成软骨细胞生长因子、转化生长因子β和地塞米松中，Ⅱ型胶原蛋白的诱导表达和蛋白多聚糖的沉积较常氧条件下明显增加。Wang等[7]将人MSCs置于5%和20%的氧浓度下向成软骨诱导，低氧下细胞分泌大量软骨相关的基质分子，包括Ⅱ型胶原和硫酸软骨素，胶原合成率比常氧下高3倍。成软骨分化受一系列转录因子操纵，最为典型的是Sox家族，家族成员Sox-9（SRY-reiated highmobility group-bos gene9）是Ⅱ型胶原合成过程中重要转录因子。低氧之所以能促进人骨髓MSCs的成软骨分化，考虑是低氧激活低氧诱导因子1a，进而活化Sox-9，使人骨髓MSCs软骨相关基质分泌增多，软骨特有的基因高表达[8]。结果表明，MSCs在形成软骨过程中，氧浓度对其代谢具有重要的调节作用，在软骨组织工程中，外源性氧浓度的控制可影响基质分子的沉积。

李宁：现任第三军医大学附属新桥医院高压氧治疗中心主任，高压氧医学教研室主任。副主任医师、副教授。从事临床肿瘤内科、高压氧医学和临床教学工作25年。现担任全国残疾人康复协会肢残创伤骨科学专业委员会常务委员、全军高压氧医学专业委员会委员、重庆市高压氧医学专业委员会委员和第三军医大学科学技术委员会医学技术专业委员会委员；被聘为国家“863”和国家、重庆市自然科学基金委评审专家；任国家卫生部卫生科研项目评审专家、教育部高校专家库成员、军队医药卫生成果鉴定、评审专家、临床医学专家库成员、重庆市沙坪坝区医学会医疗事故技术鉴定专家；《发现杂志社》副理事长、《中华医学实践杂志》和《中华综合临床医学实践杂志》常务编委、《中国临床康复杂志》、《重庆医学杂志》、《肿瘤学杂志》和《中华现代临床医学杂志》编委、《中华中西医杂志》特约编辑等专业学术职务。

负责和参与国家、军队和省部级课题研究8项，如“高压氧微环境对癌细胞增殖与分化作用机制的研究”等；主编和参编《现代肿瘤诊治进展》、《高压氧临床治疗学》、《野战内科学任职教育培训教材》、《高压氧舱技术安全与管理》和《临床肿瘤学概论》等医学专著十余部；发表医学和医学教育专业学术论文80余篇；开展高压氧临床治疗新技术新业务20余项。指导学生完成多项国家、军队和省部级课题；探索《高压氧医学》选修课程和医学继续教育在医学院校和在职培训的课程设置、教材、大纲与教学等教学研究；获得军队医疗、教学成果奖5项，如“高压氧在恶性肿瘤综合治疗中的临床应用研究”等。这些课题的研究水平与成果代表了该研究领域的新成果，并走在全国这一研究领域的前列，为高压氧综合治疗疾病开辟了一条安全、有效的新方法，为《高压氧医学》课程在医科大学的开设和普及进行了有益的探索。

2.2 低氧对 MSCs 成骨分化的影响 体外可以将 MSCs 向成骨细胞诱导，关于低氧对 MSCs 成骨分化的影响，目前尚无一致结果。Grayson 等[2]将 HBMSCs 置于 2%的氧浓度 3D 体系中培养 1 个月，MSCs 的成骨分化标记物较常氧状态时表达增多，表明低氧促进人成骨前体细胞向成骨细胞分化。然而，Malladi 等[9]却得到相反结论，21%的氧浓度条件下成骨细胞标志性基因骨钙蛋白、骨涎蛋白、Osterix(anover zincfinger-containing transcription factor)、Runx2(Runt-reiated transcription factor2)及碱性磷酸酶(ALP)的表达或活性上调，然而在 3%的氧浓度条件下这些基因及蛋白的上调被阻滞，而干细胞标记物的表达却没有改变；同样，在成骨诱导条件下长期培养时 21%的氧浓度下矿物质沉积很明显，但在低氧下(3%的氧)矿物质几乎检测不到，这是因为在体外低氧更接近生理状态，有利于 MSCs 的增殖而抑制分化。Potier 等[10]则认为不同程度的低氧及暴露于低氧环境中时间的长短，都将成为 MSCs 成骨分化的影响因素。MSCs 短暂暴露低氧(体积分数为 1%的氧)环境中对于血管生长因子的分泌刺激是有限的，但持续性低氧则下调成骨细胞标志物如 CBFal(core Binding Factor-a-1)/Runx2、骨钙蛋白、Ⅰ型胶原的表达，低氧 28 d 以上则上调骨桥蛋白 mRNA 表达。探索适宜的低氧体积分数及暴露时间，对保护 MSCs 完整的成骨分化潜能有重要意义。

3 低氧微环境在培养多功能干细胞(iPS 细胞)中的应用

日本京都大学研究人员在新一期《Cell stem cell》发表论文说，在培育诱导 iPS 细胞的过程中，通过降低培养环境的氧浓度，可大幅提高细胞生成的效率。京都大学教授山中伸弥等在 iPS 细胞研究过程中，发现机体内的干细胞总是集中于氧气相对少的地方。于是，他们在利用人体皮肤细胞培养 iPS 细胞时把培养环境的氧浓度从通常的 21%降到 5%，发现 iPS 细胞的生成效率可提高到原来的 2.5～4.2 倍。但如果进一步降低氧浓度到 1%，就会适得其反导致部分细胞死亡。研究人员又利用实验鼠的皮肤细胞培养 iPS 细胞，发现 5%的氧浓度也是最合适的。通过基因重新编排方法，“诱导”普通细胞回到最原始的胚胎发育状态，能够像胚胎干细胞一样进行分化，这就是所谓的 iPS 细胞。日本、美国等国的多个科研小组正在进行各项研究，将 iPS 细胞应用于新药开发和疑难疾病治疗。但 iPS 细胞生成效率低的问题一直没有得到解决。山中伸弥等认为，通过降低培养环境的氧浓度，再加上使用细胞癌变可能性较小的培养方法，就可高效地获取更高品质的 iPS 细胞。

4 结 语

MSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能，但其增殖与分化受多种因素影响。氧作为生命活动所必须环境因素，对 BMSCs 的增殖、分化及新陈代谢具有重要的意义。研究表明，低氧微环境对 MSCs 的增殖、分化均具有重要的调节作用。但由于实验条件与方法的不一致，如 MSCs 来源不同、氧浓度的不同，报道的结果也不尽相同。探索究竟什么样的低氧浓度最有利于 MSCs 增殖与定向分化，并阐明其相关机制具有重要的研究意义。

参考文献：

[1] D′Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MI2 AM I cells[J]. Bone, 2006, 39: 513.

[2] Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs[J]. J Cell Physiol, 2006, 207: 331.

[3] Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear rep rogramming of porcine mesenchymal stem cells[J]. Biol Rep rod, 2006, 74: 46.

[4] Xie XJ, Wang JA, Cao J, et al. Differentiation of bonemarrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxicconditions[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27: 1153.

[5] Moussavi HF, Duwayri Y, Martin JA, et al. Oxygen effects onsenescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering[J]. Iowa Orthop J, 2004, 24: 15.

[6] Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, et al. Hypaxia promotes chondrogenesis in rat mesnchymal stem cells: a role for AKT and hypxia-inducible factor(HIF)-1 alpha [J]. J Cell Physiol, 2008, 216(3): 708.

[7] Wang DW, Fermor B, Gimble JM, et al. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells[J]. J Cell Physiol, 2005, 204: 184.

[8] Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, et al. Hypoxia induces chondrocyte specific gene expression in mesenchymal cells in association with eranscriptional activation of Sox-9[J]. Bone, 2005, 37(3): 313.

[9] Malladi P, Xu Y, Chiou M, et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adiposederived mesenchymalcells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290: 1139.

[10] Potier E, Ferreira E, Andrianmanalijaona R, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogennic differention and angiogenic factor expression[J]. Bone, 2007, 40(4): 1078.

(收稿日期：2009-08-25 修回日期：2009-10-25)