

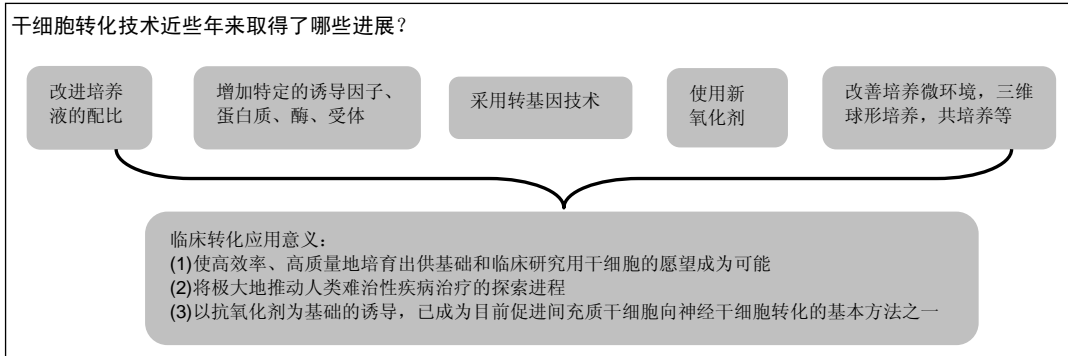
干细胞转化技术是干细胞基础和未来临床移植研究的基石

涂雪松(北京脑血管病医院神经科, 北京市 100039)

引用本文: 涂雪松. 干细胞转化技术是干细胞基础和未来临床移植研究的基石[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):128-134.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.023 ORCID: 0000-0001-5435-8225(涂雪松)

文章快速阅读:



涂雪松, 男, 1947年生, 福建省长汀县人, 主治医师, 主要从事脑血管病、神经干细胞方面的研究。

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2016)01-00128-07
稿件接受: 2015-11-12
<http://www.crter.org>

文题释义:

血管内皮生长因子:是一种强有力的血管生成因子, 新生的血管内皮细胞可形成“血管龛”, 通过释放某些神经营养因子促进神经发生。新生的神经细胞也可促进血管发生, 二者之间存在“交叉对话”, 血管内皮生长因子在其中发挥着非常重要的媒介作用。

共培养:目前已成为流行的干细胞培养方法。共培养分为2种, 接触共培养是指将干细胞与某种成体细胞放在一起保持接触, 优点是促进两种细胞更多分泌酶或因子及细胞融合, 增加干细胞的转化率, 而且可以开展三维培养, 缺点是难以避免两种细胞间的相互污染。非接触共培养是指将两种细胞放在一起, 但用具有渗透性的物质隔开, 优点是能避免两种细胞间的相互污染, 缺点是限制了细胞间的密切接触, 影响了细胞间的信号传导, 减弱了干细胞的分化效率。

摘要

背景: 干细胞转化技术研究已成为干细胞研究的一个活跃领域, 对干细胞基础研究及临床研究均产生巨大的推动作用。

目的: 对干细胞转化技术研究现状及进展做一综述。

方法: 在标题和摘要中, 以“Stem cells, Transformation, differentiation”或“干细胞, 转化, 分化”为主题检索词, 检索中国期刊全文数据库(CNKI)、PubMed数据库中2000年1月至2015年4月关于干细胞分化技术的文章。优先选择近期发表或在权威杂志上的文章。初检得到121篇文章, 根据纳入标准, 选择其中的64篇进行综述。

结果与结论: 干细胞转化技术近些年来取得了较大的进展, 包括改进培养液的配比, 增加特定的诱导因子、蛋白质、酶、受体, 注射特定的基因, 使用新氧化剂, 改善培养微环境, 在低氧环境下培养, 使用支架, 采用转基因技术, 三维球形培养, 共培养等。干细胞转化新技术的诞生和使用, 显著提高了干细胞的转化率, 为人类难治性疾病的治疗带来希望。

关键词:

干细胞; 移植; 诱导多能干细胞; 间充质干细胞; 骨髓间充质干细胞; 神经干细胞; 胚胎干细胞; 精原干细胞; 肌肉干细胞; 贴壁培养; 共培养; 三维培养; 支架; 增殖; 分化; 转化

主题词:

干细胞; 转化型研究; 组织工程

Stem cell conversion technology is a footstone for stem cell basic and clinical research in the future

Abstract

BACKGROUND: Stem cell conversion technology has become an active area in the field of stem cell research, and it also has a tremendous boost on both the stem cell basic research and clinical study.

OBJECTIVE: To review the research status and the current progress of stem cell conversion technology.

METHODS: In the titles and summaries, the “stem cells, conversion, differentiation” in Chinese and English served as the search terms to search articles related to stem cells technology published from January 2000 to April 2015 in CNKI and PubMed databases. The latest articles or articles published on the authoritative journals

Tu Xue-song (Department of Neurology, Beijing Cerebrovascular Disease Hospital, Beijing 100039, China)

Tu Xue-song, Attending physician, Department of Neurology, Beijing Cerebrovascular Disease Hospital, Beijing 100039, China

Subject headings: Stem Cells; Translational Research; Tissue Engineering

were preferred. Totally 121 articles were obtained after initial survey, and according to the inclusion criteria, 64 articles were selected for overview.

RESULTS AND CONCLUSION: The progress of stem cells conversion technology has driven the development of the entire stem cell research, including modifying the ratio of culture medium, increasing specific inducers, proteins, enzymes or receptors, injecting specific genes, using new oxidizing agents, modifying culture microenvironment, culture under hypoxia, scaffold usage, applying transgenic technology, three-dimensional spherical culture or co-culture. Stem cell conversion technology will definitely increase the conversion rate of stem cells, which can bring hope for the treatment of refractory diseases.

Cite this article: Tu XS. Stem cell conversion technology is a footstone for stem cell basic and clinical research in the future. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):128-134.

0 引言 Introduction

干细胞转化技术是研究如何安全、有效地将干细胞转化为另一种干细胞或成体细胞的技术。近些年,干细胞转化技术极大地带动了干细胞转化基础研究的进展。人类已能利用干细胞转化技术,将干细胞转化为人体内所有的细胞。美国约翰霍普金斯大学的研究人员利用干细胞转化技术,将诱导多能干细胞转化为视网膜前体细胞,再将视网膜前体细胞培育成视网膜组织功能性感光细胞^[1]。日本理化研究所的 Kadoshima等^[2]开发了一种新型的细胞培养技术,将人类胚胎干细胞诱导成为大脑皮质细胞。在干细胞转化技术的推动下,干细胞移植研究,不论在迁移、分化、作用、作用机制,还是在安全性等方面,近些年均得到长足进展。Ng等^[3]的研究显示,移植的干细胞具有定向迁移到病灶的能力。Xiang等^[4]的研究发现,移植的间充质干细胞具有定向迁移至受损组织器官(“归巢”)的特性。Jensen等^[5]的研究发现,神经干细胞移植后,不但能迁移到受损神经区域,而且可以分化为不同类型的神经细胞,代替受损的细胞行使其功能。Parekkadan等^[6]的研究证实,移植的间充质干细胞对组织器官具有修复再生作用。Chang等^[7]的研究发现,移植的间充质干细胞能促进骨再生和修复。Ma等^[8]的临床研究证实,干细胞移植不但可以通过修复肝组织来抑制肝硬化发展,而且可以减少肝硬化转化为肝癌的风险。Taylor等^[9]的研究证实,干细胞移植能有效改善心肌梗死后的心肌功能。但有研究显示,干细胞移植并不能改善心肌功能。Von Lueder等^[10]提出心肌梗死后瘢痕组织形成导致的心功能持续恶化,是导致心肌干细胞移植治疗效果不能长期保持的原因之一。Neves等^[11]的研究显示,移植间充质干细胞到宿主体内通过分泌神经生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等多种营养因子,发挥营养神经作用。Kemp等^[12]的研究证实,体外或移植至体内的间充质干细胞,可以通过分泌超氧化物歧化酶发挥抗氧化作用。Ji等^[13]的研究显示,间充质干细胞植入到模型动物体内,会分布到各组织器官,而且不会引起组织细胞坏死。干细胞移植研究的进展,为治疗人类难治性疾病带来了希望。Zhang等^[14]的研究发现,骨髓间充质干细胞的神经分化潜能,为神经疾病的临床治疗带来了希望。Hao等^[15]的研究发现,神经干细胞移植后,在神经疾病动物模型脑组织内分化为神经细胞,改善了模型动物的受损神经功能。法国

普瓦捷大学实验室和临床神经科学实验室与布鲁塞尔人类和分子生物学跨学科研究所合作,在成年小鼠的大脑皮质上进行移植胚胎干细胞实验,结果发现,这些多能性干细胞不但分化为皮质神经元,而且参与受损成年大脑回路的重建^[16]。加拿大英属哥伦比亚大学的研究人员将人体胚胎干细胞转化的胰腺祖细胞移植到2型糖尿病模型大鼠体内,结果发现这些移植细胞分化为能分泌胰岛素的 β 细胞,而且模型大鼠对胰岛素的敏感性和葡萄糖新陈代谢得到改善^[17]。目前,干细胞转化技术需要解决的一个问题是培养效率。只有达到高效率的培养,才能满足干细胞基础和临床研究的需要。干细胞调控机制的研究是干细胞转化基础研究中的一个重要的方面,与提高干细胞转化的效率和安全关系密切。现将干细胞转化技术及调控机制的研究进展做一个综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由作者应用计算机检索中国期刊全文数据库(CNKI)(<http://dlib.cnki.net/kns50/>)和PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)相关文献。检索时间范围:2000年1月至2015年4月。中文检索词为:干细胞,转化,分化;英文检索词为“Stem cells, Transformation, differentiation”。共检索到文献121篇。

1.2 入选标准 ①论点、论据可靠的文章。②同一领域的文献选择近期发表或权威杂志的文献。

1.3 质量评估 初检得到英文文献198篇,中文文献3篇。先阅读标题和摘要进行初筛,排除与研究目的不符或重复性文章,再查阅全文,按照纳入标准,最后选择64篇文献进行综述。

2 结果 Results

2.1 使用成本低廉的培养液,将诱导多能干细胞转化为安全性高的心肌细胞 在将干细胞转化为成体细胞的过程中,均需要在培养液中加入葡萄糖。日本庆应大学的Tohyama等^[18]开发出一种不含葡萄糖的成本低廉的培养液,用这种培养液对诱导多能干细胞进行培养,培养出心肌细胞,经检测这种心肌细胞中几乎不含诱导多能干细胞。研究者将这种心肌细胞移植到猴子的心脏,结果未发现移植细胞发生癌变。这种技术成本低廉,而且得到的细胞纯度高(达99%),移植安全性高,是理想的

干细胞转化技术。

2.2 使用新的贴壁培养方法和新的诱导因子, 将人类干细胞高效转化为运动神经元 中国科学院成都生物研究所研究人员和美国科学家开发出了一种新的贴壁培养方法^[19], 将人类胚胎干细胞(hESCs)和人类诱导多功能干细胞(hiPSCs)分化为运动神经元。以往的培养方法, 分化程序繁琐、费时(2个月)、需要遗传操作和反复的病毒感染以及低效低产等。与旧的培养方法相比, 新的培养方法快速(约20 d)、高效(约70%)、高产(>250%), 而且有效地避免了病毒感染。研究人员发现, 在将人类胚胎干细胞和人类诱导多功能干细胞培育成运动神经元的过程中, 苯丙酸去甲肾上腺酮化学抑制剂化合物C和BMP信号等神经形成诱导因素和胰岛素基因增强结合蛋白1(ISL1)是不可缺少的。

2.3 通过优化培育条件及表达3个肝脏转录因子, 将人成纤维细胞转化为肝细胞 中科院上海生化与细胞所的科学家通过优化培育条件及表达3个肝脏转录因子^[20], 利用诱导多能干细胞技术将人皮肤细胞转化为肝细胞, 经检测这些肝细胞表达肝脏基因, 并具有肝细胞的许多功能, 包括分泌血清白蛋白、积累糖原、代谢药物、药物转运等。未来, 该研究团队将与南京鼓楼医院、华东理工大学等科研机构合作, 进行生物肝的合成研究, 为开展重症肝病的肝移植创造条件。

2.4 通过注射一种叫做TBX18的基因, 利用体细胞重编程技术, 将猪的心肌细胞转化为心脏起搏细胞 美国锡达斯-赛奈心脏研究所的研究人员把一种叫做TBX18的基因注射到6只存在“完全心脏传导阻滞”的心律异常猪的心脏内, 利用“体细胞重编程”的技术, 使一种本来不参与控制心律的心脏细胞转变成为“起搏器细胞”^[21]。这些猪在接受基因疗法治疗后, 原本应该减慢的心跳恢复正常, 效果持续2周时间。

2.5 通过神经干细胞的某种小分子RNA(miRNA)发挥作用, 促进和恢复神经干细胞向神经细胞分化 日本庆应义塾大学和理化学研究所的研究人员最新研究发现, 神经干细胞分化成各种神经细胞的能力逐渐下降, 变得只能分化为支持神经元活动的神经胶质细胞, 而且通常是不可逆的, 还发现神经干细胞的某种小分子RNA(miRNA)是神经干细胞分化成神经元阶段必不可少的^[22]。研究人员在研究衰老的不可再分化出神经元的神经干细胞中, 让这种miRNA发挥作用, 发现衰老神经干细胞重新获得了分化为神经元的能力。

2.6 为干细胞创建合适的微环境, 将肌肉干细胞转化为肌肉细胞 美国杜克大学的生物医学工程师发现, 在发达的收缩性肌纤维中有被称为卫星细胞的肌肉干细胞池, 研究人员为这些干细胞创建微环境, 培养出与真实肌肉非常相似的组织工程骨骼肌^[23]。它能够快速有力地收缩, 植入小鼠体内很快与机体融合。电脉冲刺激检测结果显示,

它比以往制造的任何仿生肌肉都要强壮10倍以上。

2.7 向骨骼肌干细胞添加“miR-195”和“miR-497”两种小核糖核酸, 确保移植的骨骼肌干细胞全部或大部分分化为骨骼肌细胞 日本京都大学教授濑原淳子率领的研究小组发现, 向骨骼肌干细胞添加“miR-195”和“miR-497”这两种小核糖核酸后, 可以维持骨骼肌干细胞的修复能力。小核糖核酸是一类不编码制造蛋白质的单链核糖核酸分子, 主要参与控制基因表达。研究人员将这种骨骼肌干细胞移植到患有肌肉萎缩症的实验鼠腿部, 发现腿部的骨骼肌细胞开始增加, 肌肉得以再生^[24]。

2.8 在培养液中添加去甲肾上腺素等干细胞生长促进剂及在特定的三维环境中培养, 将脐血干细胞转化为少突胶质细胞 美国中佛罗里达大学的Davis等^[25]先在培养液中加入包括去甲肾上腺素等在内的干细胞生长促进剂, 然后将其放在三维环境中进行培养, 结果发现, 脐血干细胞先转化为少突胶质前体细胞, 再转化为少突胶质细胞。

2.9 加入骨髓干细胞特定受体的抗体, 将骨髓干细胞转化为神经前体细胞 斯克里普斯研究所的Takebe等^[26]通过筛选找到了一种能激活骨髓干细胞特定受体的抗体, 然后将其加入到骨髓干细胞培养液中, 结果在体外培养出神经前体细胞, 再将神经前体细胞培育成神经细胞。

2.10 将骨髓干细胞放置在低氧环境下培育, 将其转化为类髓核细胞 Prado-Lopez等^[27]研究揭示, 降低氧体积分数可以抑制胚胎干细胞的未分化因子的表达。Ezashi等^[28]研究显示, 低氧微环境对维持胚胎干细胞的分化潜能具有重要作用。Chen等^[29]研究证实, 经体外培养后干细胞可以转化为类髓核细胞。培养类髓核细胞是为干细胞移植治疗退变椎间盘提供种子细胞。干细胞体外培育通常分为常氧组(20%)和低氧组。哪种方法更有利于干细胞转化为类髓核细胞呢? Stoyanov等^[30]的对比研究发现, 在低氧(2%)的环境下, 骨髓干细胞更易转化为类髓核细胞。

2.11 以血管内皮生长因子和维生素C为诱导剂, 将胚胎干细胞转化为心肌细胞和血管细胞 干细胞向特定的体细胞转化, 通常转化率很低, 而且与周围组织的融合率差, 如Zhang等^[31]的研究显示, 干细胞向心肌细胞的转化率低, 而且转化的心肌细胞难与宿主组织融合。为了提高干细胞体外培养的分化率, 通常需要加诱导剂, 常用的诱导剂有二甲双胍、5-氮胞苷等。这些化学诱导剂毒性作用大, 难以广泛应用。有学者开始寻找无毒的诱导剂。Chen等^[32]的研究发现, 血管内皮生长因子能作为一种胚胎干细胞向心肌细胞转化的诱导剂, 能促进胚胎干细胞向心肌细胞转化, 而且发现, 这种作用在质量浓度为20 mg/L时最明显。血管内皮生长因子的生物活性是促进血管生成。有学者提出, 血管内皮生长因子通过与其受体结合, 激活心肌特异性转录因子, 促进干细胞向心肌细胞转化。Takahashi等^[33]采用维生素C作为诱导剂,

显著提高了干细胞向心肌细胞的转化率,而且浓度在 10^{-4} mol/L以下时,浓度越高,转化率越高。Nourse等^[34]的研究发现,采用添加生长因子的培养基可以将胚胎干细胞转化为血管内皮细胞。

2.12 通过改良无血清悬浮培养法及向培养液中添加骨形成因子,将人类胚胎干细胞转化为包括睫状缘在内的立体视网膜组织 睫状缘在调节眼球焦点远近的睫状体出现前就存在于胎儿期的视网膜中。研究人员发现,在睫状缘内存在干细胞。如果这种干细胞能发挥增殖功能,就能在试管中形成视网膜。日本理化学研究所研究人员改良了无血清悬浮培养法。他们在培养初期向培养液中添加骨形成因子,当培养至第150天时,获得了与胎儿期视网膜大小和形状都非常相似的含睫状缘的立体视网膜组织。研究人员惊喜地发现,此次开发的分化诱导新技术性能稳定,且分化效率达80%。研究人员认为,此次实验的成功,为了解视网膜形成机制提供了线索,而且为未来开展视网膜色素变性症等眼疾的治疗提供了可能性^[35]。

2.13 通过加入特殊的蛋白质,将肾脏内的成体干细胞培育成含有肾小管和肾小球等结构、具有部分肾脏功能的类似肾单位的立体管状组织 日本冈山大学和杏林大学的研究人员从成年实验鼠肾脏内采集了成体干细胞,在培养皿内制作出细胞团块,然后将细胞团块放入凝胶状物质中,再加入促其生长的特殊蛋白质。3至4周后,他们培养出了50-100个类似肾单位的立体管状组织。这些组织含有肾小管和肾小球等结构,并具有部分肾脏的功能^[36],这是世界上首次利用动物的成体干细胞制作出立体的肾脏组织。

2.14 在培养液中加入调制的包括头蛋白(Noggin)的蛋白质混合液,并按加入一定剂量的视黄酸,培养出胃细胞,最终形成类胃器官 最近,美国科学家在实验室成功引导人类干细胞经过胚胎阶段发育,培养出微型“胃”。研究人员通过加入调制的蛋白质混合液及一定剂量的视黄酸,第34天时培养出直径只有几毫米的类胃器官^[37]。

2.15 在培养液中加入干细胞因子,体外诱导精原干细胞分化 Feng等^[38]用含干细胞因子的培养液培养精原干细胞,第8天有大于25 μ m的细胞出现。如不加入干细胞因子,就没有大于25 μ m的细胞出现。Yuan等^[39]对这些大细胞进行了免疫荧光染色法鉴定,结果发现这些大细胞上有精母细胞的生物标记,证明这些大细胞就是精母细胞。

2.16 采用三维球体培养,增加间充质干细胞的干性保持及分化能力 干细胞体外培养方法有贴壁培养、组织消化、密度梯度分选、免疫磁珠分选法,但目前普遍使用的多为单层贴壁培养以及三维无支架培养。单层贴壁培养是1952年Dulbecco开展的。该法是利用间充质干细胞易于贴壁生长,造血细胞多悬浮生长而创造的一种干细胞体外培养方法^[40]。单层贴壁培养操作简单、环境的可控性强、样品特征性和均一性好、分化潜能保存好,但需

多次换液。多次换液会导致部分干细胞提前分化、影响定向分化及增加以后纯化的难度。二维培养容易造成间充质干细胞的衰老和自分化,容易导致间充质干细胞的活性、干性保持及分化潜能弱化^[41]。三维培养是最理想的干细胞培育方法。三维球状生长最有利于细胞的发育、功能表达和发挥对外界不良刺激的反应能力^[42]。Kapur等^[43]的研究显示,三维培养增强了骨髓间充质干细胞的干性及分泌细胞因子的能力。Huang等^[44]的研究发现,三维培养增强了骨髓间充质干细胞向骨细胞、脂肪细胞分化的能力。Bartosh等^[45]将经三维培养的骨髓间充质干细胞移植到缺血性心脏病动物模型病灶内,结果发现,模型动物的缺血缺氧状况得到改善,同时发现,移植的骨髓间充质干细胞分泌血管内皮生长因子的能力及向血管内皮细胞转化的能力均得到提高。研究者认为,三维球体培养法导致间充质干细胞分泌促血管内皮生长因子增加,导致间充质干细胞向心脏血管内皮细胞转化增加,是干细胞移植试验取得临床效果的原因。

2.17 通过共培养方法,促进干细胞转化为成体细胞 化学剂诱导是常用的将干细胞转化为成体细胞的培育方法。近年来,共培养成为干细胞转化技术的研究热点。学者们尝试通过这种方法培育出供研究用的各种成体细胞。通过共培养的方法将成体间充质细胞转化为神经细胞的实验已获成功^[46-47]。

Kaigler等^[48]将间充质干细胞与血管内皮祖细胞进行体外接触式共培养,结果发现,与单独培养相比,间充质干细胞向骨细胞的转化能力得到显著提高。Grellier等^[49]的研究发现,骨髓间充质干细胞与内皮细胞共培养,可以增加骨形态蛋白的表达和血管内皮生长因子的分泌。骨形态蛋白的表达增强可以促进骨髓间充质干细胞转化为骨细胞。Zurita等^[50]通过与许旺细胞接触和隔离共培养两种方法,将骨髓间充质干细胞转化为神经元样细胞。Vodyanik等^[51]通过人胚胎干细胞与小鼠骨髓基质细胞(OP9或S17细胞)共培养,得到了血管内皮前体细胞。这些内皮前体细胞随后转化为血管内皮细胞。Kaigler等^[52]在间充质干细胞与内皮细胞的接触共培养研究中发现,碱性磷酸酶活性提高,骨钙素分泌增加。碱性磷酸酶是间充质干细胞中一种特定的成骨因子。碱性磷酸酶活性提高,表明间充质干细胞向骨细胞的转化能力得到提高。

2.18 以 β -巯基乙醇+维甲酸为抗氧化剂,提高骨髓间充质干细胞向神经细胞的转化率 在实验室条件下,将干细胞转化为神经细胞的诱导方法包括以细胞因子、抗氧化剂、提高细胞内cAMP和神经细胞培养上清液为基础的方法。常用的抗氧化剂有 β -巯基乙醇和维甲酸。李倩等^[53]在培养液中加入碱性成纤维生长因子、多聚赖氨酸、二甲基亚砷及3种不同的抗氧化剂,观察骨髓间充质干细胞的转化情况,结果发现, β -巯基乙醇+维甲酸组培育10 d的神经细胞转化率最高(71.63%和79.72%)。

2.19 通过转基因技术,提高骨髓间充质干细胞向软骨细胞转化的能力 Cao等^[54]以腺病毒为载体,将Sox-9基因导入兔骨髓间充质干细胞中,结果发现,兔骨髓间充质干细胞转化为软骨细胞的能力得到增强。目前,已知的能够用于增强骨髓间充质干细胞转化为软骨细胞的基因有转化生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、骨形态蛋白、抗凋亡蛋白基因Bcl-xL、Elsler及北美萤火虫荧光素酶、 β -大肠杆菌半乳糖苷酶等。

2.20 通过使用诱导因子,促进间充质干细胞向软骨细胞及骨细胞的转化 诱导因子在间充质干细胞的定向分化中起着关键的作用。这些诱导因子包括转化生长因子、骨形态蛋白、透明质酸等。骨形态蛋白是转化生长因子 β 家族成员,具有很强的干细胞成骨诱导作用。有研究显示,骨形态蛋白2的主要作用是诱导间充质干细胞不可逆地分化为软骨细胞和骨细胞。骨形态蛋白对成体细胞不具有诱导成骨作用。Iwakura等^[55]在开展的滑膜来源间充质干细胞向软骨细胞转化的实验中发现,转化生长因子 β 1与骨形态蛋白联合依次使用,能促进滑膜来源间充质干细胞向软骨细胞的转化。Bhumiratana等^[56]通过转化生长因子 β 诱导,促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞转化,合成了一种机械性能好的生物软骨。Worster等^[57]的研究发现,在一定的培养条件下,透明质酸可以增加骨髓间充质干细胞向骨细胞的转化能力。

2.21 将干细胞种植在由特殊材料组成的支架上,提高干细胞的增殖能力 Erickson等^[58]将骨髓间充质干细胞接种到由丙酮酸透明质酸交联水凝胶高聚物组成的支架上,结果发现,随着高聚物密度的增加,骨髓间充质干细胞向软骨细胞和基质细胞转化的能力得到提高,但机械性能却下降。透明质酸是一种分布在多种组织细胞外基质的蛋白多糖。羟基磷灰石具有无毒、低免疫反应、高生物相容、生物可分解以及人体可吸收等特性^[59],适合制作支架。近年来人们发现,如果在羟基磷灰石制成的支架结构上进行干细胞培育,干细胞的增殖、迁移和分化得到增强,而且安全性好。许多研究从适合细胞生长的角度证实了透明质酸适合多种干细胞生长的特性。近年来,人们尝试采用透明质酸作为3D支架^[60]。3D干细胞培养法分为3D无支架和3D有支架两种。3D无支架培养实现了干细胞高密度3D悬浮培养,但随着神经球尺寸的增大,球内细胞生长所需营养无法及时从球外获得,导致球中心部位出现大量细胞凋亡和坏死。3D有支架培养方法是将细胞接种到特定的支架材料上来支持细胞在3D空间的生长^[61]。人体中的细胞在正常情况下呈三维球状生长,更有利于细胞的生长。3D有支架培养方法能更好地模拟体内的基质和血液循环的环境^[62],因此,与3D无支架培养相比,3D有支架培养方法显著提高了干细胞

的培育效果,促进了干细胞的分化。

2.22 在培养液中加入转化生长因子 β 3,促进干细胞向类髓核细胞转化 以往的研究显示,转化生长因子 β 具有在体外将干细胞诱导为类髓核细胞的转化能力。Clarke等^[63]将人骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞放在含有转化生长因子 β 3的培养液中培养,结果发现,髓核细胞标志物表达得到增强,表明转化生长因子 β 可以促进干细胞向类髓核细胞的转化。

2.23 将干细胞在放在基底膜基质中培养,诱导干细胞向成体细胞转化 已有研究表明,基底膜基质可以促进干细胞的分化而不是增殖。基底膜基质之所以具有这种功能,是因为其含有诱导干细胞分化所需要的蛋白和因子,可以为干细胞分化提供良好的人工环境。除了有学者在基底膜基质中将骨髓间充质干细胞诱导为软骨细胞外,Lancaster等^[64]还在基底膜基质中将干细胞诱导为类脑组织。

3 小结 Conclusions

干细胞转化技术的发展日新月异,新技术不断涌现,使转化率显著提高,有力地促进了干细胞移植技术的开展。现在,国家已批准在具备条件的医院开展帕金森病的干细胞移植试验研究,这对广大的帕金森病患者来说是一大福音,也对干细胞转化技术提出了更高的要求,如何改进干细胞转化技术,培育出合格的和更多地多巴胺细胞?相信,在科学技术进步的带动下,在干细胞基础研究日益深入成果不断的情况下,干细胞转化技术一定会迎来全面发展的阶段。

作者贡献: 文章的构思、设计、资料收集、成文及审校均为涂雪松。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. Nat Commun. 2014;5:4047.

- [2] Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(50):20284-20289.
- [3] Ng CP, Sharif AR, Heath DE, et al. Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM. *Biomaterials*. 2014;35(13): 4046-4057.
- [4] Xiong N, Zhang Z, Huang J, et al. VEGF-expressing human umbilical cord mesenchymal stem cells, an improved therapy strategy for Parkinson's disease. *Gene Ther*. 2011;18(4): 394-402.
- [5] Jensen MB, Yan H, Krishnaney-Davison R, et al. Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22(4):304-308.
- [6] Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(2):247-252.
- [7] Chang Z, Hou T, Xing J, et al. Umbilical cord Wharton's jelly repeated culture system: a new device and method for obtaining abundant mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *PLoS One*. 2014;9(10):e110764.
- [8] Ma J, Both SK, Ji W, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as monocultures or cocultures with human umbilical vein endothelial cells: performance in vitro and in rat cranial defects. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(4):1026-1036.
- [9] Taylor J. Boosting acute myocardial infarction treatment with stem cells. *Eur Heart J*. 2014;35(16):1015-1016.
- [10] von Lueder TG, Wang BH, Kompa AR, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Heart Fail*. 2015;8(1):71-78.
- [11] Neves D, Santos J, Tomada N, et al. Aging and orchidectomy modulate expression of VEGF receptors (Flt-1 and Flk-1) on corpus cavernosum of the rat. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1067: 164-172.
- [12] Kemp K, Gray E, Mallam E, et al. Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2010;6(4):548-559.
- [13] Ji F, Duan HG, Zheng CQ, et al. Comparison of chloromethyl-dialkylcarbocyanine and green fluorescent protein for labeling human umbilical mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2015;37(2):437-447.
- [14] Zhang C, He X, Li H, et al. Chondroitinase ABC plus bone marrow mesenchymal stem cells for repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2013;8(11):965-974.
- [15] Hao L, Zou Z, Tian H, et al. Stem cell-based therapies for ischemic stroke. *Biomed Res Int*. 2014;2014:468748.
- [16] Michelsen KA, Acosta-Verdugo S, Benoit-Marand M, et al. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron*. 2015;85(5):982-997.
- [17] Bruin JE, Saber N, Braun N, et al. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Reports*. 2015;4(4):605-620.
- [18] Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):127-137.
- [19] Qu Q, Li D, Louis KR, et al. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun*. 2014;5:3449.
- [20] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):370-384.
- [21] Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, et al. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. *Sci Transl Med*. 2014;6(245):245ra94.
- [22] Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, et al. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4): 1604-1609.
- [23] Juhas M, Engelmayr GC Jr, Fontanella AN, et al. Biomimetic engineered muscle with capacity for vascular integration and functional maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(15):5508-5513.
- [24] Sato T, Yamamoto T, Sehara-Fujisawa A. miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat Commun*. 2014;5:4597.
- [25] Davis H, Guo X, Lambert S, et al. Small Molecule Induction of Human Umbilical Stem Cells into MBP-positive Oligodendrocytes in a Defined Three-Dimensional Environment. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(1):31-39.
- [26] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499(7459):481-484.
- [27] Prado-Lopez S, Conesa A, Armiñán A, et al. Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells*. 2010;28(3):407-418.
- [28] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4783-4788.
- [29] Chen S, Emery SE, Pei M. Coculture of synovium-derived stem cells and nucleus pulposus cells in serum-free defined medium with supplementation of transforming growth factor-beta1: a potential application of tissue-specific stem cells in disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(12): 1272-1280.
- [30] Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater*. 2011;21:533-547.
- [31] Zhang Y, Wang D, Chen M, et al. Intramyocardial transplantation of undifferentiated rat induced pluripotent stem cells causes tumorigenesis in the heart. *PLoS One*. 2011;6(4):e19012.
- [32] Chen Y, Amende I, Hampton TG, et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(4):H1653-1658.
- [33] Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation*. 2003;107(14):1912-1916.

- [34] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(1):80-89.
- [35] Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, et al. Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. *Nat Commun.* 2015;6:6286.
- [36] Kitamura S, Sakurai H, Makino H. Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute three-dimensional nephron structures in vitro. *Stem Cells.* 2015;33(3):774-784.
- [37] McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature.* 2014;516(7531):400-404.
- [38] Feng LX, Chen Y, Dettin L, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science.* 2002;297(5580):392-395.
- [39] Yuan L, Liu JG, Zhao J, et al. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell.* 2000;5(1):73-83.
- [40] Han YF, Tao R, Sun TJ, et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology.* 2013;65(5):819-827.
- [41] Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *iomaterials.* 2012;33(6):1748-1758.
- [42] Ohkura T, Ohta K, Nagao T, et al. Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(5):373-378.
- [43] Kapur SK, Wang X, Shang H, et al. Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. *Biofabrication.* 2012;4(2):025004.
- [44] Huang GS, Dai LG, Yen BL, et al. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials.* 2011;32(29):6929-6945.
- [45] Bartosh TJ, Wang Z, Rosales AA, et al. 3D-model of adult cardiac stem cells promotes cardiac differentiation and resistance to oxidative stress. *J Cell Biochem.* 2008;105(2):612-623.
- [46] Ni Y, Zhang K, Liu X, et al. miR-21 promotes the differentiation of hair follicle-derived neural crest stem cells into Schwann cells. *Neural Regen Res.* 2014;9(8):828-836.
- [47] Guan M, Xu Y, Wang W, et al. Differentiation into neurons of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw.* 2014;25(3):58-63.
- [48] Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J.* 2005;19(6):665-667.
- [49] Grellier M, Granja PL, Fricain JC, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials.* 2009;30(19):3271-3278.
- [50] Zurita M, Vaquero J, Oya S, et al. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport.* 2007;18(16):1713-1717.
- [51] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood.* 2005;105(2):617-626.
- [52] Kaigler D, Wang Z, Horger K, et al. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res.* 2006;21(5):735-744.
- [53] 李倩,杨军.优化培养基加快骨髓间充质干细胞的诱导分化[J].中国组织工程研究,2015,18(45):7246-7249.
- [54] Cao L, Yang F, Liu G, et al. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2011;32(16):3910-3920.
- [55] Iwakura T, Sakata R, Reddi AH. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein in synovial explants with TGF- β 1 and BMP-7. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(23-24):2638-2644.
- [56] Bhumiratana S, Eton RE, Oungoulian SR, et al. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(19):6940-6945.
- [57] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2000;61(9):1003-1010.
- [58] Erickson IE, Huang AH, Sengupta S, et al. Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(12):1639-1648.
- [59] Li Z, Cui Z. Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnol Adv.* 2014;32(2):243-254.
- [60] Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell.* 2007;130(4):601-610.
- [61] Ge D, Song K, Guan S, et al. Culture and differentiation of rat neural stem/progenitor cells in a three-dimensional collagen scaffold. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170(2):406-419.
- [62] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689.
- [63] Clarke LE, McConnell JC, Sherratt MJ, et al. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R67.
- [64] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-379.