文章编号:1004-7220(2011)05-0482-05

·综述·

力学因素在间充质干细胞构建功能性组织工程化软骨中的作用

于 波[1,2], 朱振安[1]
(1.上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科,上海市骨科内植物重点实验室,上海 200011;
2.山东中医药大学附属医院 骨科,济南 250014)

摘要:间充质干细胞具有多向分化潜能,可定向分化为软骨组织,并且取材广泛、体外扩增能力强,是广泛应用于软骨组织工程的理想细胞之一。由于关节软骨具有重要的生物力学功能,需要强调和评估间充质干细胞构建组织工程化软骨组织的力学生物学性能。为更好地了解和认识修复软骨的诱导因素、信号通路与力学特性之间的关系,本文回顾了间充质干细胞在功能性软骨组织工程研究中的力学生物学研究进展,并论述了该领域内目前存在的问题及若干可供探索的途径和新方向。

关键词:力学生物学;生物力学;间充质干细胞;力学特性;组织工程
中图分类号:R 318.01 **文献标志码**:A

Role of mechanobiology in mesenchymal stem cell-based tissue engineered cartilage

YU Bo[1,2], ZHU Zhen-an[1](1. *Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Department of Orthopaedics Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai* 200011, *China*; 2 *Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250014, *China*)

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs) is an ideal cell type extensively used in cartilage multipotency to differentiate into cartilage and can be isolated from a wide variety of tissue sources with strong *in vitro* expansion. Since cartilage has the important mechanical properties, it is necessary to highlight and evaluate the mechanobiological properties of MSC-based tissue engineered cartilage. To better understand the relationship between inducing factor of cartilage repair, signal pathway and mechanical properties, this paper reviews the advances made on research of mechanobiology in MSC-based tissue engineering cartilage, discusses the existing problems in this field, and try to point out some new approaches or directions worthy of such investigation.

Key words: Mechanobiology; Biomechanics; Mesenchymal stem cells (MSCs); Mechanical properties; Tissue engineering

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的生物学特性使之成为软骨组织工程的理想"种子"细胞。组织工程学的发展虽然为软骨修复与再生带来了新契机,但单纯利用组织工程学方法构建的组织块尚无法满足功能上的需要。MSCs构建的软骨组织需要与周围组织间需要形成良好的整合并达到一定的强度,并且结构组成必须满足被替代软骨组织固有及必要的生物力学特性。组织工程化软

收稿日期:2011-07-18;**修回日期**:2011-08-19
通讯作者:朱振安,Tel:(021)63139920;E-mail:zhuzhenan2006@126.com。

骨组织的力学特性将最终决定体内移植的成功与否。

功能性组织工程学(functional tissue engineering, FTE)是在组织工程学的基础上逐渐发展起来的,重点强调对组织工程化组织的力学特性等功能性评价。力学生物学(mechanobiology)因素是实现组织工程化关节软骨功能性重建的重要内容。力学生物学是21世纪以来国际生物力学研究领域的最新发展趋势之一。力学生物学将研究重心从力学移到生物学,是生物力学细胞分子水平的机制研究,探讨力学环境(刺激)对生物体健康、疾病或损伤的影响,研究生物体的力学信号感受和响应机制,阐明机体的力学过程与生物学过程如生长、重建、适应性变化和修复等之间的相互关系[1]。

本文回顾了MSCs在功能性软骨组织工程研究中的力学生物学研究进展,并论述了该领域内目前存在的问题及若干可供探索的途径和新方向。

1　MSCs构建工程化软骨的力学特性

软骨是由软骨细胞和高度特异性的细胞外基质构成的疏松结缔组织。根据细胞外基质的生化成分和分子结构不同而分为透明软骨、弹性软骨和纤维软骨,各种软骨根据其功能具有截然不同的生物力学特性。正常软骨的总模量是1.0 MPa,可渗透性为$(1\sim10)\times10^{-15}$ $m^4/(N\cdot s)$[2],运动时软骨受到的压强约0~20 MPa。软骨细胞对力学刺激敏感以维持正常的基质平衡,适当的力学载荷可增加基质合成和生物机械特性,过高强度或频率的负荷可导致软骨细胞外基质的破坏。软骨组织中具有承载性能的大分子为各种类型的胶原(包括Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅸ和Ⅺ型)和蛋白聚糖,Ⅱ型胶原是软骨的特定表型[3]。软骨组织的力学性质取决于细胞外基质,而非软骨细胞。

MSCs构建的组织工程化软骨组织的基础研究是为了向临床转化,取得疗效。因此,组织工程化软骨组织的力学特性将最终决定体内移植的成功与否。通过鉴定细胞表型标记物是判断软骨形成的合适证明,但并不一定与其力学性能相匹配。对组织工程化软骨组织的力学特性关注较少,少数研究测试的结果也不甚理想,虽然以MSCs为种子细胞来源诱导分化的软骨细胞其表型标记物都有表达(有些多于软骨细胞),但其力学性能较人体自身软骨组织差,或只相当于完全分化的软骨细胞所构建的软骨组织。

Erickson等[4]检测观察到牛MSCs种植在琼脂糖水凝胶支架材料上诱导软骨形成时,软骨组织的力学和生物化学特性随着时间而增强。体外培养8周后,组织切片显示蛋白多糖的强有力沉积。但其力学特性不及牛软骨细胞来源构建的软骨组织。Cheng等[5]研究发现人脂肪来源MSCs来源构建的软骨组织的压缩模量在42 d后可达到150 kPa。Huang等[6]研究表明在短暂性TGF-β3作用下,MSCs构建软骨组织的压缩模量可达200 kPa。蛋白多糖达到湿重的2%~3%。这些数值较单纯培养液培养组呈显著性增高,但不及添加促软骨分化生长因子的诱导效应大。除了采用压缩性能作为力学性能检测指标之外,Huang等[7]对拉力特性做了比较,结果显示MSCs构建软骨组织的拉力特性远低于自身组织。这些研究结果表明MSCs构建软骨组织的功能性评价尚不全面。

2　力学刺激及效应

正常关节软骨组织在生理状态下始终伴随着力学因素的作用,力学刺激对软骨细胞的功能及软骨组织的正常发育与成熟具有重要影响。力学刺激在组织工程化软骨的构建过程中起着重要作用。因此,体外培养过程中模拟真实的体内力学环境对软骨细胞生长、增殖、分化具有重要意义。在利用组织工程学方法构建功能性关节软骨的过程中,现有技术还无法完全模拟关节腔内复杂的力学环境。研究人员已通过大量实验证明,动态压力、循环静水流压力、剪切力、离心力等都能在一定程度上促进MSCs向软骨分化,并提高软骨组织的生物学稳定性。

2.1　压应力

Huang等[8]研究发现压应力诱导骨髓MSCs成软骨分化的效应与TGF-β1相同。兔MSCs在琼脂糖水凝胶支架材料上成软骨诱导时,每天加载4 h、频率1 Hz、10%的循环压应力。无论是否添加TGF-β1,循环压应力组与TGF-β1诱导组的聚集蛋白聚糖与Ⅱ型胶原基因表达相似,而力学刺激与TGF-β1共同作用的成软骨效应更佳。压应力与TGF-β1都经由TGF-β1信号通路诱导兔骨髓MSCs成软骨分

化。Huang 等[9]进一步研究发现,循环压缩应力也会提高 2 个 TGF-β1 膜受体的基因与蛋白表达,印证了其经由 TGF-β 信号通路促软骨分化。同时,研究还发现动态压缩应力载荷可同时上调 Sox-9 和 TGF-β1 基因与蛋白的表达水平。Kobayashi 等[10]对大鼠骨髓 MSCs 施加 16.0 kPa 的压应力,可诱导其向软骨细胞分化,压应力可能是通过调节内源性的细胞因子或胞外基质诱导细胞分化。Mauck 等[11]研究证实动态载荷可提高琼脂糖水凝胶支架材料上牛 MSCs 的聚集蛋白聚糖活性。研究还发现 sGAG 的沉积量会增多,但不及 TGF-β3 的诱导效应。Kisiday等[12]采用相似的加载方式证实在未添加 TGF-β时,也会提高 sGAG 的沉积,但不及 TGF-β 的诱导作用。

2.2 张应力

细胞与细胞通过胞外基质相互连接,并实现细胞之间的相互通讯与牵拉作用,因此可通过弹性基底膜的形变来实现对贴壁生长的细胞牵拉研究张应力对体外细胞的影响。目前常用的加载系统有:轴向拉伸(单向或双向)、四点弯曲模型、真空作用模型。

Hamilton 等[13]对培养的 MSCs 施加频率 1 Hz、10% 的张应力,持续时间为 7 d,发现细胞增殖受到抑制,细胞内 F-actin 发生重排,并与应变方向垂直,同时 α-actin 和 H1 重链的表达显著提高,提示 MSCs 向软骨细胞分化。McMahon 等[14]研究发现拉伸应力可提高 MSCs 的成软骨分化和 GAG 合成。与之相反,Haudenschild 等[15]研究证实拉张应力促进藻酸盐小球内 MSCs 向成纤维细胞及成骨细胞分化,而压应力可上调成软骨分化基因的表达。拉伸应力通过 β-catenin 信号通路抑制成软骨分化。

2.3 流体静力压

Angele 等[16]研究证实循环流体静力压载荷可提高蛋白多糖和胶原含量,促进 MSCs 成软骨分化。吕昌伟等[17]以 5 r/min 旋转培养 2 d,而后以 12 r/min (0.2 Hz)维持周期性流体刺激 2 周可显著促进兔骨髓 MSCs 软骨分化发生,提高Ⅱ型胶原和蛋白多糖等软骨特异性基质的沉积,材料整体形态反而比单纯静止培养更容易维持;材料内部的营养交换明显改善,细胞活力比单纯的静止培养提高很多。Miyanishi 等[18]研究发现循环流体静力压载荷可提高 Sox9 mRNA、Ⅱ型胶原 mRNA 及聚集蛋白聚糖 mRNA 表达。此外,单纯应用循环流体静力压载荷仍可提高 Sox9 mRNA、Ⅱ型胶原 mRNA 及聚集蛋白聚糖 mRNA 水平,但其表达水平较 TGF-β3 诱导后低。Miyanishi 等[19]在另外一项研究中证实不同强度的循环流体静力压载荷(0.1、1 或 10 MPa)促进 MSCs 成软骨分化的能力不同,在 10 MPa 时的Ⅱ型胶原 mRNA 水平和胶原含量较高。Wagner 等[20]发现循环流体静力压载荷可使骨髓 MSCs 成软骨分化标记基因如聚集蛋白聚糖、Ⅱ型胶原和 Sox9 表达上调,而成骨分化标记基因 Runx2 表达无改变。与上述研究结果相反,Zeiter 等[21]研究认为无论是否有 TGF-β 或 BMP-2 诱导时,流体静力压对 MSCs 小球成软骨分化和细胞外基质的沉积无作用。

3 影响力学刺激对 MSCs 软骨分化效应的调节因素

力学刺激的量级、持续时间和频率都会影响其对 MSCs 软骨分化的效应。Miyanishi 等[19]在 TGF-β3 诱导条件下比较不同量级的间歇性流水静压力对人 MSCs 的成软骨分化效应。细胞外基质及胶原表达随着载荷的增加而增多,II 型胶原 mRNA 在 10 MPa 时的表达达到峰值。许多研究[11,16,22]表明力学刺激的持续时间越长,其诱导成软骨分化(GAG 含量、聚集蛋白聚糖及Ⅱ型胶原)的能力越强。Mouw 等[23]研究发现早期(8 d)力学刺激降低聚集蛋白聚糖的表达,晚期(16 d)提高了成软骨分化基因表达。这表明 MSCs 力学刺激反应变化受到成软骨分化的不同阶段和细胞外基质的变化影响。绝大多数研究设定的力学频率是 0.5 或 1 Hz,接近正常步态时软骨细胞所承受的力学频率。Pelaez 等[24]研究发现 1 Hz 频率较 0.1 Hz 具有更强的人骨髓 MSCs 诱导软骨分化能力。

利用 MSCs 构建工程化软骨时,经常需要联合应用生长因子,如 TGF-β1 和 IGI-I 等,力学刺激促 MSCs 软骨分化是否需要特定的生物活性因子尚未有定论。有研究[11,25]认为力学刺激促进 MSCs 软骨分化不需要添加 TGF-β,而也有研究[23]认为 TGF-β 是 MSCs 软骨分化的必要条件,与力学加载可产生协同效应,能明显地改善构建组织的组成和力学特性,超过单一刺激产生的作用。

4　结论与展望

近年来,随着对 MSCs 成软骨分化研究的深入,构建功能性的组织工程化软骨组织取得了一些成果。但是,MSCs 构建组织工程化软骨组织的力学特性仍未达到天然软骨的水平,甚至不及软骨细胞构建的软骨组织。建立标准化、临床化和产业化的功能性组织工程化关节软骨,仍有许多问题尚待解决。MSCs 修复软骨损伤的关键是提高和维持工程化软骨组织的天然力学特性和软骨细胞表型。为达到这个目标,需要在以下几个方面做出努力:

(1) 需要进一步了解 MSCs 的异质性。MSCs 存在一些不能使细胞外基质沉积的细胞类型,它们会消耗营养成分,继而减少功能性基质的沉积。选择更好的细胞表型筛选方法,或者是建立干细胞的力学性界定标准,可以显著提高 MSCs 成软骨分化的效率和一致性。永生性透明软骨(和软骨细胞)具有出众的初始建立基质功能,继而抵抗向成骨表型分化,这些细胞应该成为成软骨细胞的"黄金标准"[26]。按照"黄金标准",可筛选出最佳诱导成分和力学载荷方式,诱导出具有合适功能特性、生化组成和关节软骨细胞表型的工程化软骨。

(2) 需要深入探讨 MSCs 成软骨分化的分子机制研究。自 20 世纪 90 年代至今,成软骨分化所采用的诱导因子就相对固定不变。虽然这些诱导因子能成功诱导出成软骨分化的一些特征,但缺点是不能使 MSCs 完全具有软骨表型。因此,需要大力挖掘其他具有调控软骨分化的因子,更需要考虑到力学因素在调控 MSCs 分化和基质合成中的作用。虽然在研究早期发现了力学因素可提高某些软骨标记物的表达,但是软骨的功能性研究进展缓慢。下一步要重点研究最合适的力学载荷方式、力学量级、作用时间、频率设定和预培养阶段等因素,以最大可能地提高力学刺激信号来产生细胞外基质沉积。同时,软骨细胞内力学信号传递通路存在复杂的级联关系,要深入探索力学信号传递的本质。

总之,通过对 MSCs 构建功能性组织工程化软骨的力学生物学研究,可建立力学标准以筛选理想的成软骨分化细胞类型以提高 MSCs 成软骨分化效能,从细胞、分子水平阐明力学因素诱导 MSCs 成软骨分化的生物学作用、力学信号调控通路,揭示工程化软骨组织在细胞与分子水平上与力学环境的相互作用机制,最终使 MSCs 构建功能性组织工程化软骨在临床中广泛应用。

致谢: 感谢国家自然科学基金项目(30973038),国家青年自然科学基金项目(81001529),山东省自然科学基金项目(Q2008C18),上海教委重点学科建设基金项目(J50206)的资助。

参考文献:

[1] 姜宗来. 我国生物力学研究现状与展望[J]. 中国生物医学工程学报,2011,30(2):161-67.

[2] 汤亭亭,裴国献,李旭,等. 骨科生物力学暨力学生物学[M]. 济南:山东科学技术出版社,2009:221.

[3] Wan LQ, Mow VC. 述评:关节软骨的细胞与分子生物力学[J]. 医用生物力学,2008,23(1):1-18.
Wan LQ, Mow VC. Cellular and molecular biomechanics: The articular cartilage paradigm- A review [J]. J Med Biomech, 2008, 23(1): 1-18.

[4] Erickson IE, Huang AH, Chung C, *et al.* Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(5): 1041-1052.

[5] Cheng NC, Estes BT, Awad HA, *et al.* Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2): 231-241.

[6] Huang AH, Stein A, Tuan RS, *et al.* Transient exposure to transforming growth factor beta 3 improves the mechanical properties of mesenchymal stem cell-laden cartilage constructs in a density-dependent manner [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(11): 3461-3472.

[7] Huang AH, Motlekar NA, Stein A, *et al.* High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis [J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(11): 1909-1921.

[8] Huang CY, Hagar KL, Frost LE, *et al.* Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 313-323.

[9] Huang CY, Reuben PM, Cheung HS. Temporal expression patterns and corresponding protein inductions of early responsive genes in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells under cyclic compressive loading [J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1113-1121.

[10] Kobayashi N, Yasu T, Ueba H, *et al.* Mechanical stress

promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells [J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1238-1245.

[11] Mauck RL, Byers BA, Yuan X, *et al.* Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading [J]. Biomech Model Mechanobiol, 2007, 6(1-2): 113-125.

[12] Kisiday JD, Frisbie DD, McIlwraith CW, *et al.* Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10): 2817-2824.

[13] Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: Implications for vascular tissue-engineering applications [J]. Tissue Eng, 2004, 10(3-4): 361-369.

[14] McMahon LA, Reid AJ, Campbell VA, *et al.* Regulatory effects of mechanical strain on the chondrogenic differentiation of MSCs in a collagen-GAG scaffold: Experimental and computational analysis [J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(2): 185-194.

[15] Haudenschild AK, Hsieh AH, Kapila S, *et al.* Pressure and distortion regulate human mesenchymal stem cell gene expression [J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(3): 492-502.

[16] Angele P, Yoo JU, Smith C, *et al.* Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro [J]. J Orthop Res, 2003, 21(3): 451-457.

[17] 吕昌伟,胡蕴玉,白建萍,等. 周期性流体应力刺激对组织工程软骨分化影响的实验研究[J]. 骨与关节损伤杂志,2003, 18(9): 620-622.

[18] Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, *et al.* Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro [J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 1419-1428.

[19] Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, *et al.* Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro [J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 2253-2262.

[20] Wagner DR, Lindsey DP, Li KW, *et al.* Hydrostatic pressure enhances chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in osteochondrogenic medium [J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(5): 813-820.

[21] Zeiter S, Lezuo P, Ito K. Effect of TGF beta1, BMP-2 and hydraulic pressure on chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stromal cells [J]. Biorheology, 2009, 46(1): 45-55.

[22] Terraciano V, Hwang N, Moroni L, *et al.* Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels [J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2730-2738.

[23] Mouw JK, Connelly JT, Wilson CG, *et al.* Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells [J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 655-663.

[24] Pelaez D, Huang CY, Cheung HS. Cyclic compression maintains viability and induces chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin gel scaffolds [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(1): 93-102.

[25] Campbell JJ, Lee DA, Bader DL. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells [J]. Biorheology 2006, 43(3-4): 455-470.

[26] Yamane S, Cheng E, You Z, *et al.* Gene expression profiling of mouse articular and growth plate cartilage [J]. Tissue Eng, 2007, 13(9): 2163-2173.