

·综述·

脂肪来源干细胞移植治疗骨骼肌损伤和萎缩的研究进展*

刘晓光¹ 肖卫华^{1,2} 赵淋淋¹ 陈佩杰¹

骨骼肌是人体最重要的器官之一,是维持身体基本状态及运动能力最重要的器官。骨骼肌具有较强可再生能力,骨骼肌这种再生能力在很大程度上依赖于骨骼肌内一些未分化的肌源性前体细胞——骨骼肌卫星细胞^[1-2]。但当骨骼肌严重损伤或者伴有某种疾病(如肌萎缩)时,肌卫星细胞数量有限,骨骼肌的这种再生能力受到限制,不能进行正常的自我修复,严重影响其功能。干细胞移植治疗骨骼肌萎缩和损伤,是再生医学的热点话题,也是精准医学的热点话题^[3]。胚胎干细胞、脐带血间充质干细胞、骨髓间充质干细胞在促进骨骼肌再生方面都具有很高的应用价值,但受伦理道德、技术瓶颈以及来源等诸多条件限制而不能得到广泛应用^[4-5]。最近研究发现,脂肪来源干细胞(adipose derived stem cells, ASCs)和上述其他干细胞相似,具有自我更新和多向分化的潜能。且同其他干细胞相比,脂肪来源干细胞具其独特的优点。如,脂肪组织分布广泛、身体储备量高;通过抽脂术既可获得,方法简单安全,不会给患者带来疼痛及不便;脂肪组织中干细胞含量高,大约是骨髓间充质干细胞含量的二百多倍^[6-8]。正因这些独特的优点,使脂肪来源干细胞在治疗骨骼肌损伤和萎缩,促进骨骼肌再生方面有很高的应用前景。越来越多的证据表明,脂肪来源干细胞移植治疗骨骼肌损伤或者骨骼肌萎缩,可显著促进骨骼肌再生,因而ASCs在治疗骨骼肌再生有很高的临床应用价值^[9-12]。国内对ASCs的关注主要在整形及美容方面,对治疗骨骼肌损伤及肌萎缩关注尚少。

为了加深对ASCs治疗骨骼肌损伤及肌萎缩的认识,了解国内外最新的研究进展,本文对近几年的文献进行了系统梳理。

1 脂肪来源干细胞概述

1.1 脂肪来源干细胞起源

Zuk等^[13]通过抽脂技术首次从人体内脂肪组织中分离出干细胞,这些干细胞在体外能稳定扩增数倍,且表现为较低

的老化水平。同时,他们还发现这些从脂肪组织中分离出的干细胞在体外可以分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞和肌细胞等,并将这种细胞称之为“抽脂后处理细胞”(processed lipoaspirate, PLA)^[13]。随着研究的深入,对这种细胞的命名也多样化,如脂肪来源间充质细胞(adipose derived stromal cells, ADSCs)、脂肪来源干细胞以及脂肪组织基质血管组分(stromal vascular fraction, SVF)等^[14-17]。为了更好地进行研究,国际脂肪应用技术协会将从脂肪组织分离的、具有塑料粘附性的、多能细胞群定义为:脂肪来源干细胞^[18]。

1.2 脂肪来源干细胞特征

Vieira等^[19]发现,ASCs表达12种细胞表面蛋白,包括HLA-DR, HLA-ABC, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117。在ASCs传代到第4代,hASCs不表达内皮标志(CD31-PECAM)或者造血标志(CD34, CD45, CD117-c-kit)。大部分ASCs高表达CD13, CD44,以及粘附标志(CD39-integrin β 1, CD90-Thy-1)和间充质细胞标志CD73(SH3)。同时,ASCs不表达HLA-II(HLA-DR)少量表达HLA-I(HLA-ABC)^[20],因而具有免疫特赦的特征。正因如此,ASCs可自体移植,也可以在不同个体或者不同物种之间进行移植,且不会引起免疫抑制^[21-23]。

虽然ASCs具有一些相同的细胞表面抗原以及一些特定标记,但是也有很多文章报道称,不同部位脂肪组织来源ASCs具有不同的特点。如腹部来源ASCs和上臂来源ASCs相比,具有更高的抗凋亡能力,皮下白色脂肪组织和内脏脂肪组织相比,前者具有更高的ASCs含量,但是臂部脂肪组织ASCs的含量最高。和其他部位ASCs相比,腹股沟脂肪组织ASCs具有最强的可塑性^[24]。最近有文献报道称,分散存在于白色脂肪组织中的棕色脂肪组织也含有ASCs,且棕色脂肪组织中的ASCs更容易分化成骨骼肌细胞^[25]。

1.3 脂肪来源干细胞的获取及一般移植方法

将脂肪组织剪碎,用含有双抗的PBS充分冲洗干净;添加胶原酶,在37℃水浴箱中孵育30—90min,加入胎牛血清

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.09.024

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300975;31271273);教育部博士点基金项目(20133156120004);运动健身科技省部共建教育部重点实验室(上海体育学院)资助

1 上海体育学院运动科学学院,上海,200438; 2 通讯作者

作者简介:刘晓光,男,在读硕士研究生; 收稿日期:2016-01-19

终止消化;离心后通过400 μ m的细胞筛,过滤掉未消化的部分,然后低速离心;离心后试管中的沉淀即SVF。SVF是一种由多种细胞组成的细胞群,包括循环血细胞、成纤维细胞、周细胞、内皮细胞和ASCs等;将SVF在红细胞裂解液中冰上孵育10min,用含有双抗的PBS冲洗,离心后接种到条件培养基中培养。在条件培养基中粘附性细胞群即ASCs^[6,9,15,26]。随着研究的深入,获取ASCs的方法也在不断改进,且能工业化生产。如Cytori Therapeutics Inc.(San Diego, CA, USA)研发一种称作CelutionTM的系统,可从脂肪组织分离和浓缩ASCs。通常1h, CelutionTM系统装置可处理250ml吸取的脂肪组织^[12,27]。

通常,ASCs移植的方法有两种,既骨骼肌局部注射和静脉注射,有时也将两种方法结合起来,都可取得良好的效果^[9-11]。一般情况下,骨骼肌损伤后1周注射移植ASCs,这样可以避开急性炎症反应阶段,提高移植细胞的成活率^[14]。ASCs移植治疗骨骼肌损伤和肌萎缩时,移植的细胞数量一般在 1×10^5 — 1×10^7 之间,视移植个体的大小而定。通常情况下,通过静脉注射移植的细胞数量较骨骼肌局部注射移植多^[6,12,14,20]。

2 脂肪来源干细胞移植治疗骨骼肌萎缩和骨骼肌损伤

研究表明,移植ASCs到萎缩骨骼肌能显著促进已经萎缩的骨骼肌再生,且具有良好的治疗效果。杜兴氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种严重的肌肉萎缩性疾病,其特征是骨骼肌纤维膜缺乏抗肌萎缩蛋白。这种抗肌萎缩蛋白的缺失,会导致骨骼肌损伤和萎缩,严重影响人的健康。Liu等^[11]发现,移植FLK-1⁺脂肪来源干细胞到mdx小鼠骨骼肌,可促进抗肌萎缩蛋白的表达,改善mdx小鼠肌肉萎缩状况。不仅如此,Pinheiro等^[9]移植ASCs到mdx小鼠腓肠肌,发现ASCs移植能显著促进萎缩骨骼肌再生。具体表现为,和对照组相比,经ASCs移植治疗组骨骼肌收缩力量显著增加、抗疲劳能力增强、肌纤维横断面积增加、有中央核肌纤维数量增加、肌细胞生成素的含量增加以及炎症因子表达下降和蛋白合成增加。

ASCs移植不仅能治疗骨骼肌萎缩,还能加速骨骼肌损伤后的恢复过程。Bacou等^[28]研究发现,移植ASCs到心脏毒素诱导损伤的胫骨前肌,其促进骨骼肌损伤修复的效果和移植肌卫星细胞的效果相似。移植ASCs组和对照组相比,可促进骨骼肌重量、肌纤维横断面积和最大收缩力量显著增加。Mori等^[12]的研究也进一步证明了ASCs移植可促进骨骼肌损伤后的恢复过程。他们将ASCs移植到撕裂损伤裸鼠胫骨前肌,发现移植ASCs组和对照组相比,移植ASCs组骨骼肌快速收缩力量和强直收缩力量显著增加、再生肌纤维面积显著增加、毛细血管密度显著增加、纤维化面积显著减少。

3 脂肪来源干细胞移植治疗骨骼肌萎缩和损伤的作用机制

3.1 脂肪来源干细胞直接分化成肌细胞、肌卫星细胞促进骨骼肌再生

和其他干细胞相似,ASCs具有强大的定向分化能力,在不同条件培养基中培养可分化成不同的细胞,如软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞和骨骼肌细胞等^[4,29-30]。Zuk等^[13]发现,用生肌条件培养基培养ASCs 6w,会使ASCs细胞伸长,像已分化的成肌细胞,且表达骨骼肌早期分化标志(MyoD、myogenin)和骨骼肌末期分化标志(肌球蛋白重链),提示ASCs在生肌条件培养基培养可能定向分化成骨骼肌细胞。liu等^[11]发现ASCs不仅可以分化成骨骼肌细胞,也可以分化成肌卫星细胞。移植ASCs到损伤处组织,ASCs可能通过分化成成肌细胞或者肌卫星细胞的方式,参与骨骼肌再生。但是,并非所有的研究都认同这个观点。Vieira等^[19]发现,ASCs与分化阶段人DMD成肌细胞共培养时,ASCs通过细胞融合的方式参与肌形成,而非通过分化成骨骼肌细胞或者肌卫星细胞的方式参与肌形成。骨骼肌萎缩和损伤后再生过程是一个非常复杂而精妙的过程,作者认为,移植ASCs到损伤或者萎缩骨骼肌中,可能是部分通过融合或者分化成骨骼肌细胞、肌卫星细胞的方式参与骨骼肌再生过程,也可能是以分化成骨骼肌细胞或卫星细胞为主,以细胞融合的方式为辅,多种方式参与骨骼肌再生过程。

3.2 脂肪来源干细胞通过分泌多种细胞因子、生长因子和生血管因子参与骨骼肌再生

ASCs除直接分化成骨骼肌细胞或者肌卫星细胞直接参与骨骼肌再生外,还能通过分泌一些细胞因子、生长因子和生血管生长因子等参与骨骼肌再生过程,且大量研究者认为ASCs参与骨骼肌再生主要是依赖其分泌功能^[12,14-15,24]。Wang等^[31]发现,在体外TNF可以通过p38MAPK依赖性信号途径刺激ASCs分泌肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和血管内皮细胞生长因子等。HGF是一种重要的骨骼肌关键再生因子,外源性补充HGF可以激活静息状态下的肌卫星细胞、促进成肌细胞增殖和迁移,从而促进骨骼肌再生^[32]。IGF-1也是一种关键骨骼肌再生因子,可以通过激活肌卫星细胞、促进成肌细胞增殖、分化,促进蛋白质合成、抑制蛋白质分解等方式促进肌肉再生^[33-34]。VEGF是重要的促血管再生因子,主要通过促进损伤组织血管再生,改善局部微环境,促进骨骼肌损伤后再生和功能恢复^[35]。同时,也有研究发现,ASCs也可分泌基质细胞衍生因子-1参与促进血管再生^[36]。骨骼肌疾病或者骨骼肌损伤后常伴有炎症反应,这些炎症因子可以进一步激活所移植的ASCs,促进细胞因子、生长因子和生血管因子的表达,来参加骨骼肌再生过程。

3.3 脂肪来源干细胞通过抑制骨骼肌纤维化,促进骨骼肌

再生

在骨骼肌再生过程中,纤维化影响骨骼肌再生及功能恢复。Hwang等^[10]用人ASCs和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)混合水凝胶联合治疗撕裂腓肠肌。发现ASCs组和对照组相比,撕裂伤腓肠肌纤维化面积显著较低,而ASCs和bFGF联合干预组撕裂伤腓肠肌纤维化的面积最低。不仅如此,Sun等^[37]在兔骨骼肌受辐射损伤后,肌肉内注射ASCs,发现和对照组相比能显著减小纤维化面积。Western blot分析发现,移植ASCs能显著降低TGF- β 1的表达。而TGF- β 1与骨骼肌纤维化的形成密切相关,通常可以作为一个纤维化程度的指标,因此,ASCs可能通过抑制TGF- β 1表达,抑制骨骼肌纤维化,促进骨骼肌再生。

3.4 脂肪来源干细胞通过调控巨噬细胞极化和炎症反应,促进骨骼肌再生

骨骼肌萎缩或损伤后会发生炎症反应,表现为巨噬细胞和嗜中性粒细胞浸润增多。如何调控骨骼肌炎症反应及嗜中性粒细胞、巨噬细胞表型变化,是促进骨骼肌再生的关键举措。研究发现,ASCs可调控巨噬细胞极化和炎症反应,促进骨骼肌再生。如,Pinheiro等^[9]移植ASCs到mdx小鼠腓肠肌,发现ASCs移植的骨骼肌和对照组相比,促炎细胞因子TNF- α 、IL-6、ROS以及T淋巴细胞标记(CD3)的表达量显著下降,而抑炎细胞因子IL-10、IL-4的表达量显著增加。而且,ASCs来源外泌体也可以抑制T细胞的分化和激活,同时能下调炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ)的释放^[38]。Hao等^[39]进一步研究ASCs抑制炎症反应的机制,认为ASCs可能通过PGE2-EP2/4轴促进IL-10表达,极化M2巨噬细胞,抑制炎症因子TNF- α 和IL-6的表达。同时,也有研究称ASCs通过旁分泌机制,促进巨噬细胞向M2c巨噬细胞极化,增强巨噬细胞对凋亡中性粒细胞的吞噬作用,进一步减弱炎症反应^[40]。

4 小结

骨骼肌是人体最重要的器官之一,虽然骨骼肌具有较强的可再生能力,但是当骨骼肌严重损伤或者骨骼肌疾病(如肌萎缩)时,骨骼肌不能正常进行自我修复,而影响其功能发挥。脂肪来源干细胞移植可治疗骨骼肌萎缩和损伤,促进骨骼肌再生。移植的ASCs可分化成骨骼肌细胞、肌卫星细胞,也可分泌多种细胞因子、生长因子和生血管因子等参与骨骼肌再生,同时移植的ASCs也可下调TGF- β 1的表达,抑制骨骼肌纤维化,下调炎症因子表达,抑制炎症反应,改善局部微环境,促进骨骼肌再生。同时,ASCs具有储备量大、方便安全获取,以及具有免疫特赦等特征,使其在治疗骨骼肌萎缩和损伤,促进骨骼肌再生方面具有较高的临床应用价值。但是,ASCs移植治疗骨骼肌损伤或者肌萎缩的具体深层机制并不十分清楚,如ASCs移植到骨骼肌后何时分泌细胞因子、

生长因子,何时调节炎症反应,以及它们之间存在的关联等,都需要去进一步研究探讨。

参考文献

- [1] Farup J, Madaro L, Puri PL, et al. Interactions between muscle stem cells, mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease[J]. Cell Death Dis, 2015, (6):e1830.
- [2] Fu X, Wang H, Hu P. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(9):1663—1677.
- [3] 刘晓光,肖卫华,赵淋淋,等.间充质干细胞移植治疗骨骼肌损伤的研究进展[J].中国康复医学杂志,2015,(12):1313—1317.
- [4] Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, et al. Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material[J]. Int J Stem Cells, 2015, 8(2):121—127.
- [5] Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9):17986—18001.
- [6] Forcales SV. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies[J]. Front Aging Neurosci, 2015, (7):123.
- [7] Mizuno H. The potential for treatment of skeletal muscle disorders with adipose-derived stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2010, 5(2):133—136.
- [8] Rodriguez J, Boucher F, Lequeux C, et al. Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, (6):241.
- [9] Pinheiro CH, de Queiroz JC, Guimarães-Ferreira L, et al. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle[J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(2):363—374.
- [10] Hwang JH, Kim IG, Piao S, et al. Combination therapy of human adipose-derived stem cells and basic fibroblast growth factor hydrogel in muscle regeneration[J]. Biomaterials, 2013, 34(25):6037—6045.
- [11] Liu Y, Yan X, Sun Z, et al. Flk-1⁺ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice[J]. Stem Cells Dev, 2007, 16(5):695—706.
- [12] Mori R, Kamei N, Okawa S, et al. Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(10):1150—1160.
- [13] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies

- [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2):211—228.
- [14] Peçanha R, Bagno LL, Ribeiro MB, et al. Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2012, 94(7):609—617.
- [15] Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives[J]. *An Bras Dermatol*, 2010, 85(5):647—656.
- [16] Gimble JM, Grayson W, Guilak F, et al. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, (3):69—81.
- [17] Valadares MC, Gomes JP, Castello G, et al. Human adipose tissue derived pericytes increase life span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J mice[J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(6):830—840.
- [18] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9):1249—1260.
- [19] Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro[J]. *Biol Cell*, 2008, 100(4):231—241.
- [20] Vieira NM, Bueno CR Jr, Brandalise V, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9):2391—2398.
- [21] Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(9):1397—1405.
- [22] Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(7):1407—1417.
- [23] Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(15):2770—2778.
- [24] Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(5):804—810.
- [25] Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch[J]. *Nature*, 2008, 454(7207):961—967.
- [26] Raposio E, Caruana G, Petrella M, et al. A Standardized Method of Isolating Adipose-Derived Stem Cells for Clinical Applications[J]. *Ann Plast Surg*, 2016, 76(1):124—126.
- [27] Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(4):417—426.
- [28] Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle[J]. *Cell Transplant*, 2004, 13(2):103—111.
- [29] Guilak F, Estes BT, Diekman BO, et al. 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(9):2530—2540.
- [30] Zheng B, Cao B, Li G, et al. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(7):1891—1901.
- [31] Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(4):R880—884.
- [32] 肖卫华,陈佩杰,刘宇.巨噬细胞在骨骼肌急性损伤修复中的作用研究进展[J].*中国运动医学杂志*,2014,(3):269—274.
- [33] Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury[J]. *Front Pharmacol*, 2015, (6):87.
- [34] Bikle DD, Tahimic C, Chang W, et al. Role of IGF-I signaling in muscle bone interactions[J]. *Bone*, 2015, (80):79—88.
- [35] Moimas S, Novati F, Ronchi G, et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(10):1014—1021.
- [36] Kondo K, Shintani S, Shibata R, et al. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(1):61—66.
- [37] Sun W, Ni X, Sun S, et al. Adipose-Derived Stem Cells Alleviate Radiation-Induced Muscular Fibrosis by Suppressing the Expression of TGF- β 1[J]. *Stem Cells Int*, 2016, (2016):1—9.
- [38] Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, et al. Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells[J]. *Front Immunol*, 2014, (5):556.
- [39] Hao C, Shintani S, Shimizu Y, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(6):H869—879.
- [40] 张泽宇,易军,陈光辉.脂肪间充质干细胞对巨噬细胞清除凋亡中性粒细胞的影响[J].*军医进修学院学报*,2015,(12):1—5.