

综述

巨噬细胞对间充质干细胞成骨分化影响的研究进展

Advancement of the effect of macrophage on mesenchymal stem cells in osteogenesis

易志新¹, 邹学农², 彭建强¹

(1 广东医学院附属深圳福田人民医院脊柱外科 518033 广东省深圳市;

2 中山大学附属第一医院脊柱外科 510080 广东省广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.12.12

中图分类号: Q254 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-12-1116-04

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)由于来源广泛,且具有自我增殖和多向分化潜能等特点,在再生医学和组织工程方面具有广阔的应用前景。目前,关于 MSC 成骨分化的研究很多,但对 MSC 定向成骨分化的相关机制依旧不甚清楚,导致体内、外成骨效率仍然较低。如何提高 MSC 的成骨性能已成为关注的热点。MSC 成骨性能受多种因素影响,炎症是其中一个重要因素^[1]。巨噬细胞是炎症免疫的关键调节者^[2],其对 MSC 成骨分化的影响目前还存在较大争议,尤其是在巨噬细胞与 MSC 共培养条件下和巨噬细胞相关的单个炎症因子刺激 MSC 的非共培

养条件下。笔者围绕共培养和非共培养条件下巨噬细胞对间充质干细胞成骨分化的影响综述如下。

1 MSC 成骨分化

1976 年 Friedenstein 等^[3]首次报道骨髓中存在可贴壁的、呈成纤维细胞状的、可分化成骨的基质细胞。1991 年 Caplan^[4]将这类细胞命名为 MSC。除了骨髓, MSC 还可来源于脂肪、肌肉、肝脏、外周血、胎盘、脐带等多种组织^[5-7]。MSC 具有自我更新和多向分化潜能,在适宜的条件下能增殖并被诱导分化成骨、软骨、脂肪、神经、心肌、肝脏等组织细胞^[8,9]。如何定向诱导 MSC 成骨分化是解决骨组织工程中种子细胞来源的前提。MSC 成骨分化需经过细胞转化、细胞增殖、细胞外基质合成及矿物质在细胞外基质中沉积四个阶段^[10]。Runx 相关转录因子 2(runx-related transcription factor 2, Runx2) 和成骨特异性转录因子 Osterix (OSX) 是 MSC 成骨分化的关键转录因子,可诱导下游成

第一作者简介:男(1988-),硕士研究生,研究方向:骨外科基础与临床研究

电话:(0755)83982222-3170 E-mail:number0506@126.com

通讯作者:邹学农 E-mail:zxong@hotmail.com; 彭建强 E-mail:13688806786@139.com

- density[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(6): 1789-1797.
26. Robinson Y, Robinson AL, Olerud C. Complications and survival after long posterior instrumentation of cervical and cervicothoracic fractures related to ankylosing spondylitis or diffuse idiopathic skeletal hyperostosis[J]. Spine, 2015, 40(4): E227-233.
27. Verlaan JJ, Westerveld LA, van Keulen JW, et al. Quantitative analysis of the anterolateral ossification mass in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis of the thoracic spine[J]. Eur Spine J, 2011, 20(9): 1474-1479.
28. Tauchi R, Imagama S, Satake K, et al. Epidural hematoma associated with spinal fracture in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis[J]. Turk Neurosurg, 2014, 24(1): 98-101.
29. Schiefer TK, Milligan BD, Bracken CD, et al. In-hospital neurologic deterioration following fractures of the ankylosed spine: a single-institution experience [J]. World Neurosurg, 2015, 83(5): 775-783.
30. Meyer PR Jr. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in the cervical spine[J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, 359: 49-57.
31. Yeoh D, Moffatt T, Karmani S. Good outcomes of percutaneous fixation of spinal fractures in ankylosing spinal disorders[J]. Injury, 2014, 45(10): 1534-1538.
32. Otsuki B, Fujibayashi S, Takemoto M, et al. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis(DISH) is a risk factor for further surgery in short-segment lumbar interbody fusion [J]. Eur Spine J, 2014; Epub ahead of print.
33. Lee SH. Spinal subarachnoid hematoma with hyperextension lumbar fracture in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: a case report[J]. Spine, 2009, 34(18): E673-676.

(收稿日期:2015-05-06 修回日期:2015-07-24)

(本文编辑 彭向峰)

骨基因的表达,如:骨钙素(osteocalcin,OCN)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、骨涎蛋白(bone sialoprotein,BSP)、I型胶原蛋白(collagen I, COLLa1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)等。多条信号通路通过靶向 Runx2、Osterix 等调控 MSC 成骨分化过程,主要信号通路包括转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)、Wnt/Hedgehog(HH)和 NELL-1 等信号通路^[11-13]。MSC 成骨分化受多种因素的影响,包括细胞外微环境、细胞间的相互作用、物理因素、细胞结构差异等,其中细胞外微环境是最关键因素,尤其是炎症微环境。

2 共培养条件下巨噬细胞对 MSC 成骨分化的影响

正常骨密度的维持是破骨细胞吸收与成骨细胞生成的动态平衡结果^[14]。破骨细胞和成骨细胞分别由巨噬细胞和 MSC 分化形成。目前已有大量文献证明共培养条件下巨噬细胞通过分泌不同介质,如:骨形态发生蛋白 2(BMP2)、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor alpha, TNF α)、抑素 M(oncostatin M, OSM)、外泌体等,参与调控 MSC 成骨分化。

2.1 BMP2、TNF α 介质

BMP2 是公认的诱导 MSC 成骨分化最重要的细胞外信号分子之一^[15]。早在 2002 年,Champagne 等^[16]就发现小鼠巨噬细胞在生理状态下能够分泌 BMP2,其上清与人间充质干细胞(human mesenchymal stem cell, hMSC)共培养能够促进 hMSC 成骨分化。但是,用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理过的巨噬细胞分泌大量 TNF α ,其上清抑制 hMSC 的成骨分化。Pirrao 等^[17]于 2011 年也发现利用 Transwell 培养板共培养巨噬细胞和 MSC,在 Transwell 上层板内种植人外周血来源的单核/巨噬细胞,下层板内种植人骨髓来源间充质干细胞(human bone mesenchymal stem cell, hBMSC),发现人单核/巨噬细胞能够促进 hBMSC 增殖并诱导其成骨分化,在培养基中加入 BMP2 抗体之后, MSC 成骨分化作用消失,进一步证实共培养条件下单核/巨噬细胞通过分泌 BMP2 诱导 MSC 成骨分化。同时, Omar 等^[18]指出,种植于不同材料(聚苯乙烯、金属钛)表面的经典性活化的单核细胞上清可提高 hMSC 内 BMP2 的表达而促进 hMSC 成骨分化。另外,Chen 等^[19]认为人巨噬细胞上清液可以抑制 BMP2 诱导人 MSC 成骨分化的过程,主要是由于上清液中含有大量的 TNF- α 和 IL-1 β 。Lee 等^[20]发现钛颗粒活化的小鼠巨噬细胞抑制小鼠前成骨细胞成骨分化,主要是由于巨噬细胞分泌的 TNF α 抑制了 Wnt 和 BMP2 信号通路。可见, TNF α 是共培养体系中巨噬细胞抑制 MSC 成骨分化的主要介质之一。

2.2 OSM 介质

OSM 属于白介素 6(IL-6)家族中的一类蛋白因子,因为其能抑制 A375 人黑色素瘤细胞的生长而被命名为 OSM^[21]。近年来大量文献证实共培养条件下单核/巨噬细胞可通过分泌 OSM 促进 MSC 的成骨分化。Guihard 等^[22]于

2012 年发现,经典性活化(LPS 诱导)的 M1 型外周血来源的 CD14+和骨髓来源的 CD11b+的单核巨噬细胞可通过分泌 OSM 诱导人骨髓来源的 MSC 成骨分化,而抑制其成脂肪分化。同年, Nicolaidou 等^[23]利用 Transwell 培养板进行共培养,在上层板中种植人外周血来源的单核/巨噬细胞和 hBMSC,在下层板中种植 hBMSC,发现只有在上层板中单核/巨噬细胞和 MSC 直接接触的情况下才能诱导下层板中 MSC 的成骨分化。进一步的实验发现,人单核细胞或巨噬细胞通过与骨髓来源的 MSC 直接接触后分泌的细胞因子是 OSM,而不是 BMP2 或 TGF- β 。OSM 诱导 MSC 成骨分化的主要机制是:OSM 首先与细胞表面受体——糖蛋白 130(gp130)/肿瘤抑制素 M 受体(OSMR)、gp130/白血病抑制因子受体(LIFR)结合,通过酪氨酸磷酸化途径激活 Janus kinase(JAK)激酶家族信号转导因子,活化的 JAK 因子激活信号转导和转录活化因子 3(signal transduction and activator of transcription3, STAT3)^[24],活化的 STAT3 上调下游的成骨相关基因 Runx2 和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),下调抑制因子(DKK1)等成骨抑制基因,协同促进 MSC 向成骨细胞(OB)的过渡。另外, MSC 细胞中 STAT3 活化之后,细胞表面受体 OSMR 和 LIFR 也表达上调,有利于 OSM 与 MSC 的结合,提高 MSC 的成骨效能。2013 年, Fernandes 等^[25]利用脐带血来源的祖细胞,分别加巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)形成不成熟的增殖巨噬细胞和加巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)及 NF- κ B 配体的受体激活剂(RANKL)形成破骨细胞,收集该细胞的第 3 天上清液与 MSC 进行共培养,发现巨噬细胞和破骨细胞的上清在有或无成骨诱导因子(维生素 C、 β 磷酸甘油钠、地塞米松)的情况下,都能够诱导人脂肪来源的 MSC 成骨分化;通过在上清液中加入 gp-130 抗体或 OSM 抗体后诱导 MSC 成骨分化作用消失,证实共培养条件下巨噬细胞和破骨细胞是通过分泌 OSM 活化 MSC 表面受体 gp-130 而诱导 MSC 成骨分化;同时还发现,替代性活化巨噬细胞上清液也能够诱导 MSCs 成骨分化,而经典性活化的巨噬细胞不能。上述三人的结果不尽相同,主要原因是巨噬细胞的来源、处理方法及共培养方法不同:Guihard 等强调的是巨噬细胞的表型,只有外周血来源的 CD14+和骨髓来源的 CD11b+巨噬细胞在经典性活化时才能分泌 OSM,从而促进 MSCs 成骨分化;Nicolaidou 等强调巨噬细胞只有与 MSCs 直接接触后才能分泌 OSM; Fernandes 等是利用脐带血来源的巨噬细胞。

2.3 外泌体介质

外泌体可穿梭于不同细胞的功能 RNA 和蛋白质内,是细胞间相互作用的强大介质^[26,27]。2013 年, Ekstrom 等^[28]发现单核细胞与 MSC 共培养时可通过外泌体进行相互作用。他们用 LPS 刺激人外周血来源的单核细胞,发现单核细胞分泌 CD9+、CD63+、CD81+、肿瘤特异性糖蛋白(Tsg101)+和热休克蛋白(Hsp70)+的外泌体,同时检测到外泌体内包含不同长度的 RNA。该外泌体被人骨髓来源

的 MSC 细胞吞噬后,上调细胞内成骨关键转录因子 Runx2 和 BMP2 等,促进 MSC 成骨分化。

3 非共培养条件下巨噬细胞相关炎症因子对 MSC 成骨分化的影响

巨噬细胞由外周血单核细胞分化而来,在机体固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用。在不同的外部微环境下,巨噬细胞可表现出不同的功能和表型,M1、M2 是巨噬细胞的两种主要极化类型。M1 又称经典性活化,在体外可经干扰素(IFN)或 IFN+LPS 或 TNF 诱导形成,分泌多种促炎细胞因子,包括炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-18)、趋化因子(CCL15、CCL20、CXCL8-11、CXCL13)、活性氧(ROS)和氮中间产物等,主要参与 Th1 型免疫应答,具有很强的杀伤抗原能力^[29,30];M2 又称替代性活化,主要由 IL-4 或 IL-4 和 IL-13 诱导激活,又分为 M2a、M2b 和 M2c,M2a 由 IL-4 或 IL-13 诱导形成,M2b 由免疫复合物联合 LPS 或 IL-1 β 诱导形成,M2c 由 IL-10、TGF- β 、糖皮质激素诱导形成^[31]。M2 型巨噬细胞抗原递呈能力差,主要通过分泌细胞因子,如纤维连接蛋白、基质金属蛋白酶(MMPS)、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β)等发挥抗炎及维持组织平衡功能^[32,33]。巨噬细胞通过 M1、M2 两种极化表型分泌不同的炎症细胞因子调控炎症的发生、发展过程。

促进 MSC 成骨分化,提高 MSC 成骨性能是治疗骨缺损的关键。任何影响 MSC 成骨分化的因素都将影响骨的形成及骨组织的修复与再生。不同极化状态下巨噬细胞分泌的炎症因子形成的炎症微环境是影响 MSC 成骨分化的关键。越来越多的证据表明非共培养条件下单个炎症因子参与 MSC 成骨分化的调控。Kong 等^[34]认为 TNF α 可通过关键调控因子糖原合成激酶 3 β (GSK3 β)抑制 MSC 的成骨分化。而 Hess 等^[35]认为 TNF α 通过激活核转录因子 κ b(NF- κ b)促进 MSC 成骨分化。Huang 等^[36]也发现 TNF α 在低浓度时可促进 MSC 的成骨分化,但是高浓度时却抑制 MSC 的成骨分化。同时,也有文献报道 IL-1 β 可促进人 MSC 成骨分化^[37,38]。Huh 等^[39]认为 IL-6 协同可溶性 IL-6 受体通过活化 STAT3 促进脂肪来源间充质干细胞(ASCs)成骨分化。OSM 属于 IL-6 家族,其促进 MSC 成骨分化也是主要通过 STAT3 信号通路。IL-10、IL-12、IL-18 等炎症因子对 MSC 成骨分化的影响目前未见报道。

4 小结与展望

巨噬细胞是炎症的关键调控者,在骨的修复与再生过程中同样发挥重要调节作用。大量文献已经证实巨噬细胞参与调控 MSC 成骨分化,共培养体系中巨噬细胞通过分泌 BMP2、OSM、外泌体等促进 MSC 成骨分化,分泌 TNF α 抑制 MSC 成骨分化。非共培养条件下,巨噬细胞相关炎症因子 TNF α 、IL-6、IL-1 β 及 OSM 等参与 MSC 成骨分化调控。IL-6、IL-1 β 和 OSM 单独刺激 MSC 时促进 MSC

成骨分化,而 TNF α 对 MSC 成骨分化的影响仍然存在争议。因此,可利用特定巨噬细胞及有利介质构建体外促进 MSC 成骨分化的新模型,用于临床大段骨缺损、骨不愈合等的治疗。同时,应该进一步探索在体内骨折断端及骨移植材料植入局部巨噬细胞对 MSC 成骨分化的作用及相关机制,为临床骨缺损、骨不连、骨质疏松等疾病的治疗和骨修复材料的设计与制备提供新的方法与策略。

5 参考文献

1. Raicevic G, Najar M, Pieters K, et al. Inflammation and toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(13-14): 1410-1418.
2. Zhang L, Wang CC. Inflammatory response of macrophages in infection[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(2): 138-152.
3. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.
4. Caplan AI. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641-650.
5. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.
6. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood[J]. Haematologica, 2001, 86(10): 1099-1100.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25): 13625-13630.
8. Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(3): 712-716.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
10. Javed A, Chen H, Ghorri FY. Genetic and transcriptional control of bone formation[J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2010, 22(3): 283-293.
11. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2 [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 658: 43-49.
12. Pratap J, Wixted JJ, Gaur T, et al. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7795-7802.
13. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 in

- duces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(23): 8783-8792.
14. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(5): 444-451.
15. Fakhry M, Hamade E, Badran B, et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts[J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5(4): 136-148.
16. Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, et al. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2[J]. *Bone*, 2002, 30(1): 26-31.
17. Pirraco RP, Reis RL, Marques AP. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(5): 392-400.
18. Omar OM, Graneli C, Ekstrom K, et al. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(32): 8190-8204.
19. Chen C, Uludag H, Wang Z, et al. Macrophages inhibit migration, metabolic activity and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(6): 473-483.
20. Lee SS, Sharma AR, Choi BS, et al. The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4251-4263.
21. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, et al. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(24): 9739-9743.
22. Guihard P, Danger Y, Brounais B, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4): 762-772.
23. Nicolaidou V, Wong MM, Redpath AN, et al. Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39871.
24. Sims NA, Quinn JM. Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease[J]. *Bonekey Rep*, 2014, 3: 527.
25. Fernandes TJ, Hodge JM, Singh PP, et al. Cord blood-derived macrophage-lineage cells rapidly stimulate osteoblastic maturation in mesenchymal stem cells in a glycoprotein-130 dependent manner[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73266.
26. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476.
27. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
28. Ekstrom K, Omar O, Graneli C, et al. Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75227.
29. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(3): 985-997.
30. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 750-761.
31. Mantovani A, Savino B, Locati M, et al. The chemokine system in cancer biology and therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 27-39.
32. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 317-343.
33. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 451-483.
34. Kong X, Liu Y, Ye R, et al. GSK3 β is a checkpoint for TNF- α -mediated impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironments [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(11): 5119-5129.
35. Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, et al. TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway [J]. *Bone*, 2009, 45(2): 367-376.
36. Huang H, Zhao N, Xu X, et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor α on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2011, 44(5): 420-427.
37. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, et al. Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(10): 3355-3363.
38. Mumme M, Scotti C, Papadimitropoulos A, et al. Interleukin-1 β modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells[J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 24: 224-236.
39. Huh J, Lee SY. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 2608-2616.

(收稿日期:2015-10-11 修回日期:2015-12-03)

(本文编辑 卢庆霞)