

人脂肪组织来源干细胞眼科基础研究应用现状

Application of human adipose tissue-derived stem cells in basic ophthalmic research

许薇薇 综述 黄一飞 审校
解放军总医院 眼科, 北京 100853

摘要: 脂肪组织来源干细胞属于成体干细胞范畴, 具有多能分化潜能, 有分化成不同细胞系的能力。它较容易从脂肪组织中获得, 并能在体外扩增, 在再生医学方面具有广阔的应用潜力。目前, 世界范围内, 利用人脂肪组织来源干细胞进行治疗的多项临床试验正在开展。在眼科方面, 于角膜病、视网膜病和眼眶整形方面都进行了基础及应用研究, 并得到了较为理想的结果。由于其干细胞固有特点, 其应用存在一些风险, 需对其安全性进行进一步研究并在政府的监管下开展临床研究, 以期确定脂肪组织来源干细胞的长期安全性和有效性。

关键词: 脂肪组织; 基质血管碎片; 脂肪组织干细胞; 眼科学; 自身免疫; 临床转化

中图分类号: R 329.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2013)09-1000-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2013.09.031
网络出版时间: 2013-05-15 08:34 **网络出版地址:** http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20130515.0834.001.html

早年研究证实从骨髓中分离得到的成体干细胞, 在体外条件下可大量扩增并表现多向分化潜能^[1-2]。鉴于脂肪组织与骨髓组织同属中胚层组织, 因此有学者认为脂肪组织中也应该含有类似的干细胞, 该假设被随后一系列的实验所证实。从脂肪组织中可获得两类细胞: 基质血管碎片(stromal vascular fraction, SVF)细胞和脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSC)。两类细胞都能向脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌肉细胞及心肌细胞定向诱导分化, 在软组织、骨组织修复, 缺血性疾病和自身免疫病等方面都显示出再生能力。这种再生能力的机制主要有两个方面: 直接的细胞系分化和(或)旁分泌因子的释放。而且越来越多的证据支持后者。关于ADSC的基础研究和临床应用转化都取得了加速进展。多个学科都开展了利用ADSC进行治疗的临床试验。目前, 在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)注册的有关ADSC的临床试验超过40个, 大部分是I期或者II期安全性研究。尽管这些研究通过不同的方式使用ADSC进行治疗, 但其在多个学科治疗中取得的结果是鼓舞人心的。本综述主要关注2年内的文献, 评价在再生医学领域内ADSC的基础和临床研究现状。

1 ADSC的定义、提取和性能

脂肪来源干细胞的概念由Zuk等^[3]在2001年提出, 他们将此细胞定义为: 脂肪组织来源, 可分化成为数种间充

质细胞系的干细胞。从脂肪组织中可获得两类细胞: 新鲜分离出来的具有异质性的SVF细胞; 通过培养扩增获得的相对同质的ADSC。大多数实验室通常使用胶原酶消化脂肪组织, 离心后获得细胞团, 即SVF细胞。由于未经分选和培养, 这类细胞展现出相对异质的免疫表型。SVF细胞包含多种细胞类型: B淋巴细胞、T淋巴细胞、内皮细胞、纤维母细胞、巨噬细胞、周细胞、脂肪前体细胞以及相关细胞群^[4-7]。由于ADSC可黏附在塑料上, 而SVF细胞中的其他细胞没有此特点, 所以在塑料培养皿中培养后, ADSC贴壁生长。以此可从SVF细胞中分离出ADSC。此外, 还可以凭借其特殊的细胞表面标记(CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14或CD11b, CD79⁻或CD19⁻以及HLA-DR)^[8], 通过荧光激活细胞分选法获得ADSC。ADSC是一类免疫表型相对均一的细胞^[4,9-12]。

ADSC的代谢特点(诱导新生血管、抗氧化和免疫耐受性)已经得到实验和临床前模型的证实^[13-22]。首先, ADSC具有再生能力。其分泌的细胞因子谱包括大量血管内皮生长因子、转化生长因子 β 、肝细胞生长因子、血小板来源生长因子、胎盘生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, 具有很强的诱导血管新生、抗氧化和免疫抑制能力^[23]。SVF和ADSC应用于一系列人类疾病的动物模型上时, 都表现出再生能力^[24]。其机制主要有两个方面: 第一, ADSC以旁分泌的形式释放生长因子, 加速并诱导宿主源性的细胞进行组织修复^[15,25]。目前大量研究支持这种学说^[4,26-29]。第二, ADSC具有免疫豁免的性质。因其缺乏表达人类白细胞抗原-DR, 并且能够抑制激活的外源性淋巴细胞增殖^[11,30]。ADSC还显示出抑制炎症细胞因子生成, 同时刺激抗炎细胞因子生成的作用^[29,31]。目前, 在体外和活体实验都证实了ADSC的免疫调节特性^[11,26-33]。

2 ADSC在眼科的基础研究

有关ADSC应用于眼科的研究尚集中在基础研究和动物实验阶段, 目前尚未报道这方面的临床试验。一些应用

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170830); 国家“973”重点基础研究发展规划项目(2013CB967001)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81170830); Supported by the National “973” Program for Basic Science Research Development of China(2013CB967001)

作者简介: 许薇薇, 女, 医师。专业方向: 角膜及晶状体病。Email: xuweiweidr@hotmail.com

通信作者: 黄一飞, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师。Email: 301yk@sina.com

基于脂肪组织来源干细胞的多向分化潜能;一些则基于其免疫学特性和成血管特性。

2.1 角膜病 角膜病是眼科常见多发病,主要包括感染性病变、自身免疫疾病、角膜变性以及角膜外伤。角膜组织无血管且大多数角膜细胞不具有再生能力,目前对发展到终末期的角膜病主要采取角膜移植治疗。角膜移植后存在抗排斥、原发病复燃以及视力损伤等问题。Du等^[34]从皮下脂肪组织中分离培养获得ADSC,在角膜细胞调控培养基中进行体外诱导分化。发现经过诱导分化的ADSC可以表达角膜特异性基质成分,并且具有角膜细胞的表型。这提示对于治疗角膜病,ADSC在细胞治疗和组织工程学方面具有很大潜力。Espandar等^[35]进行了进一步的体内试验,研究评价ADSC分化成角膜基质细胞的能力。他们首先进行了ADSC的三维立体培养,然后将得到的细胞移植到兔角膜上皮瓣下,发现角膜仅有非常微弱的云翳。这提示ADSC可以在角膜中很好地分化成角膜细胞。Lin等^[36]研究了ADSC治疗动物角膜碱烧伤模型的疗效。他们将人ADSC注射到碱烧伤的兔眼结膜下,发现相对于对照组,接受ADSC治疗组的兔子角膜伤口愈合更快;而且角膜的透明性更好。这些研究发现,ADSC可以作为角膜细胞的种子细胞,应用于动物模型上时取得较为理想的疗效。这提示ADSC对角膜修复的治疗具有重大临床应用潜力。

2.2 视网膜病 视网膜细胞系神经细胞,不具有再生能力,所以视网膜病变大都不可逆。干细胞具有的分化再生能力正是治疗视网膜病所急需的。2009年,Vosmerbaeumer等^[37]从吸脂手术中获得的脂肪组织分离纯化ADSC,诱导分化至视网膜色素上皮表型的细胞。他们发现,无论在视网膜色素上皮调控培养基中,还是在添加了血管活性肠肽的培养基中,诱导分化后的细胞均可表达视网膜色素上皮细胞标记并具有色素上皮细胞功能。他们的研究提示ADSC可以在体外诱导分化成视网膜色素上皮细胞。2011年,Xuqian等^[38]在动物身上进行了ADSC的疗效研究。他们制作了新西兰兔视网膜裂孔模型,从腹部脂肪中获得ADSC,将ADSC细胞悬液注射到视网膜裂孔部位,观察到:相对注射0.9%氯化钠注射液,ADSC可明显加快视网膜裂孔愈合过程。2010年Yang等^[39]使用ADSC治疗糖尿病视网膜病变大鼠模型,发现ADSC可以分化成光感受器和神经胶质样细胞,从而促进改善视网膜屏障的完整性。他们认为ADSC可能成为治疗糖尿病视网膜病变的一种有潜力的途径。这些研究的结果展现了ADSC用于治疗视网膜疾病的辉煌前景。然而,也有一些研究的结果不尽人意,Yu等^[40]于2010年将ADSC细胞移植到正在发育的小鼠眼中,观察在宿主微环境调控影响下ADSC向视网膜细胞分化情况。他们比较了小鼠大脑祖细胞和人ADSC诱导分化的情况。结果显示:ADSC的分化能力明显低于其他干细胞。分析这一结果可能是由于该研究所比较的两类干细胞分别来自人和小鼠。小鼠来源的干细胞移植到小鼠体内,排斥反应明显低于人类来源的ADSC,可以更好的在宿主微环境中受到调控分化。需要利用和宿主动物同源的ADSC或其他组织来源的多能

干细胞进行移植,比较研究它们的分化潜能。

2.3 眼外伤整形 患者罹患眼肿瘤时,常需要摘除眼球,甚至接受眶内容物剜除术以期根治肿瘤;又或遭受严重眼外伤或者眼眶骨折后,眼眶部外观受损。在这些情况下,就需要植入义眼或者在眼眶内植入人造材料重建眼部外观。而植入的义眼台或者Medpor有时会因为无法血管化或者免疫排斥而无法很好的和自体组织相容。前文已述ADSC具有诱导新生血管、抗氧化和免疫耐受的特点。利用这些特点,对ADSC在眼眶内植入方面的作用进行了一些研究。Medpor为最常见眼眶内植入材料,常用来修复眼眶骨折。Lee等^[41]用纤维蛋白和人ADSC分别处理Medpor材料,然后将Medpor植入裸鼠体内。饲养发现ADSC可以显著增加Medpor的纤维血管化进程;如果联合使用ADSC和纤维蛋白,效果更佳。由于此研究使用的动物为裸鼠,所以不能评估ADSC在抗排斥方面的作用。需要用免疫健全的动物进行有关ADSC抗免疫排斥方面的研究。

使用ADSC治疗的特点如下:1)使用的脂肪来源干细胞为自体来源或者异体来源;使用SVF细胞或者经培养得到的ADSC;2)一些研究的对象除接受脂肪组织来源干细胞外还有其他附加治疗;3)治疗使用的脂肪组织来源干细胞剂量不同;4)施用途径包括系统使用(静脉注射)或局部使用(损伤局部注射)。总的来说,这些研究报道说明ADSC用于动物实验治疗无明显不良反应,其用于临床治疗的潜力非常大。

3 结语

有关ADSC基础研究和临床应用得到越来越密切的关注。其具有以下特点:1)容易获得;2)目前的基础研究证实其具有一些吸引人的特点;3)一些动物实验证实其对眼科多类疾病具有重大应用潜力。然而,目前我国没有关于ADSC基础研究流程的标准方案。此外,其用于临床治疗的剂量及疗程也没有达成共识。故而,需要在政府的相关政策管理指导下,进行进一步的基础研究和大规模临床随机对照研究来证实ADSC的安全性和有效性。

参考文献

- 1 Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation [J]. Nat Med, 2003, 9 (6): 685-693.
- 2 马勇江,李玉谷,窦忠英. 脂肪间质干细胞研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26 (5): 89-92.
- 3 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.
- 4 McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro [J]. Stem Cells, 2006, 24 (5): 1246-1253.
- 5 Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers [J]. Stem Cells, 2006, 24 (2): 376-385.
- 6 Maumus M, Peyrafitte JA, D'angelo R, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype [J]. Int J Obes (Lond), 2011, 35 (9): 1141-1153.
- 7 Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue [J]. Cytometry A, 2010, 77 (1): 22-30.

- 8 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4): 315-317.
- 9 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.
- 10 Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (2): 376-385.
- 11 Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189 (1): 54-63.
- 12 Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226 (3): 843-851.
- 13 Moon MH, Kim SY, Kim YJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2006, 17 (5-6): 279-290.
- 14 Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 48 (1): 15-24.
- 15 Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109 (10): 1292-1298.
- 16 Kim WS, Park BS, Kim HK, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress [J]. *J Dermatol Sci*, 2008, 49 (2): 133-142.
- 17 González MA, González-Rey E, Rico L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136 (3): 978-989.
- 18 Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (12): 2542-2547.
- 19 Kang JW, Kang KS, Koo HC, et al. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17 (4): 681-693.
- 20 Neels JG, Thinnis T, Loskutoff DJ. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development [J]. *FASEB J*, 2004, 18 (9): 983-985.
- 21 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.
- 22 Eto H, Suga H, Inoue K, et al. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (5): 2322-2332.
- 23 Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (9): 1249-1260.
- 24 Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1 (2): 19.
- 25 Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells [J]. *Circulation*, 2004, 110 (3): 349-355.
- 26 Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Br J Haematol*, 2005, 129 (1): 118-129.
- 27 Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (11): 2582-2591.
- 28 Yañez R, Oviedo A, Aldea M, et al. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316 (19): 3109-3123.
- 29 Cui L, Yin S, Liu W, et al. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2 [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13 (6): 1185-1195.
- 30 Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6 (1): 7-14.
- 31 Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, et al. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10 (8): 784-795.
- 32 González MA, González-Rey E, Rico L, et al. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (4): 1006-1019.
- 33 Constantin G, Marconi S, Rossi B, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (10): 2624-2635.
- 34 Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2680-2689.
- 35 Espandar L, Bunnell B, Wang GY, et al. Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea [J]. *Arch Ophthalmol*, 2012, 130 (2): 202-208.
- 36 Lin HF, Lai YC, Tai CF, et al. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2013, 29 (1): 14-18.
- 37 Vossmerbaeumer U, Ohnesorge S, Kuehl S, et al. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11 (2): 177-188.
- 38 Xuqian W, Kanghua L, Weihong Y, et al. Intraocular transplantation of human Adipose-Derived mesenchymal stem cells in a rabbit model of experimental retinal holes [J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 46 (4): 199-207.
- 39 Yang Z, Li K, Yan X, et al. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 248 (10): 1415-1422.
- 40 Yu SH, Jang YJ, Lee ES, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells into the developing mouse eye [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2010, 43 (6): 123-130.
- 41 Lee SG, Yang JW, Park SG, et al. Effect of stem cells and fibrin concentration on the vascularization of the Medpor orbital implant [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2010, 38 (9): 885-891.