

诱导多能干细胞在骨关节炎治疗中的应用进展

张运恒 王轩 李毅

摘要 骨关节炎(OA)是一种常见的慢性关节疾病,以关节软骨退行性变和继发性骨质增生为特点,主要影响老年人,引起关节疼痛、僵硬等症状,严重者可发生关节畸形甚至残疾。目前OA治疗多以疼痛管理和关节置换为主,不能达到修复受损软骨或恢复组织稳态的目的。诱导多能干细胞(iPSC)具有很强的向软骨细胞分化的潜能,且具有可通过对体细胞重编程获得、来源较多、不涉及伦理问题等特点。iPSC的出现为软骨修复提供了新的途径,并有望在OA早期治疗中发挥重要作用。该文就iPSC在OA治疗中的应用进展进行综述。

关键词 骨关节炎;多能诱导干细胞;重编程;软骨再生

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2023.05.011

骨关节炎(OA)是一种由关节软骨退行性变引起的疾病,以关节软骨退行性变和继发性骨质增生为特点。关节软骨分解和磨损常引起关节疼痛、肿胀、僵硬等症状,通常累及膝关节、手腕、髋关节和脊柱,严重影响65岁及以上老年人的生活质量。由于软骨无血供且再生能力差,早期OA治疗包括自体软骨细胞植入(ACI)^[1]、自体骨软骨移植(OATS)及微骨折手术^[2]等,中晚期OA治疗包括截骨矫形、关节融合及关节置换。目前尚未有早期关节软骨损伤有效的治疗方法。近年来再生医学成为了OA治疗研究的热点。2006年,Takahashi等^[3]首次报道了诱导多能干细胞(iPSC),通过体外导入4种特定的转录因子将小鼠皮肤成纤维细胞重编程为类胚胎干细胞形态。iPSC具有很强的向软骨细胞分化的潜能,且具有可通过对体细胞重编程获得、来源较多、不涉及伦理问题等特点。大量研究表明,iPSC在OA早期治疗和软骨修复中具有广阔的应用前景。本文对iPSC的特点及其在OA软骨再生疗法中的应用进行综述,以期在临床上为OA软骨修复提供新的思路。

1 iPSC 特点

iPSC与胚胎干细胞十分类似,呈圆形,在显微镜下可见其细胞群由高核质体积比的细胞组成,具有清晰的边缘和较高的碱性磷酸酶活性^[4]。它的

细胞表面特征为存有阶段特异性胚胎抗原(SSEA)3、SSEA4、糖蛋白t细胞受体 α 位点(TRA1-60)等,可表达CD30、CD9、CD50、CD200和CD90^[5]。此外,iPSC的免疫原性在一定程度上可被调控。Xu等^[6]研究表明,可使用新型CRISPR/Cas基因编辑系统来生成由人类白细胞抗原(HLA)编辑的iPSC,这些iPSC可避免受到T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)的攻击。

自体软骨细胞、胚胎干细胞(ESC)和间充质干细胞(MSC)已应用于软骨再生治疗中。ACI技术可治疗的软骨细胞有限,在体外增殖传代也会导致其在培养过程中去分化。ESC在临床应用中有畸胎瘤形成的风险,且存在伦理问题。MSC能特定地分化为软骨、骨等,且可来源于脂肪、骨髓、脐带等多种组织,因此大量应用于OA治疗中,但其体外传代能力有限,而且合成及增殖能力也随着年龄增长而下降。

iPSC不仅能无限自我更新,还有分化成机体任意细胞的能力^[7]。iPSC可来源于丰富的成熟体细胞,通过重编程手段^[8]获取并用于治疗,能无创操作且无医学伦理问题。随着对iPSC研究的不断深入,*c-Myc*基因被证实可从iPSC制备过程中剔除,其余转录因子也分别有了替代品,逆转录病毒被证实可替换为质粒载体、仙台病毒等。这些都让iPSC的生产变得安全,也使iPSC的临床应用成为可能。

2 iPSC 诱导关节软骨形成

OA最早且最主要的病理变化发生在关节软

作者单位:712046 陕西咸阳, 陕西中医药大学第二临床医学院(张运恒、王轩);710054 陕西西安, 西安交通大学医学院附属红会医院足踝外科(李毅)

通信作者:李毅 E-mail: tongrenly@163.com

骨。软骨的主要功能是减震和润滑,软骨损伤会导致关节在频繁的活动中逐渐发生磨损和降解,产生OA。因此,OA治疗的关键在于对软骨进行修复。诱导真皮成纤维细胞、脂肪干细胞、脐带血单核细胞等来源的iPSC向软骨分化是解决此问题的新途径。

目前学者们进行iPSC向软骨分化的体外实验有以下4种方法。①将iPSC培养为间充质前体细胞(MPC)、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iPSC-MSC)等间充质细胞样细胞,再诱导其向软骨细胞分化。此方法可获得相对均一的软骨细胞,适用于软骨发育不良的治疗^[9]。②将iPSC培养在纤维连接蛋白包被的培养皿中以获得神经嵴细胞,再经此中间体分化为间充质细胞样细胞,进而产生软骨细胞。但研究发现其在植入软骨缺损处后不会在体内自发产生软骨^[10],必须在植入前将其分化为成软骨谱系。③通过将iPSC培养成拟胚体(EB),使iPSC转变为间充质细胞样细胞,并通过细胞分选等方式将其获得,最终完成向软骨细胞的分化。这种采用EB中间体的方法十分常用,不过其产生的间充质细胞样细胞较少,且需使用专门的生物反应培养体系。④由于iPSC有向三胚层分化的潜能,可以通过化学试剂及一些小分子物质将其持续向中胚层分化并减少其他分化方向,最后采用3D培养使其转化为软骨细胞^[11]。此方法较为节省时间且软骨成熟度高^[12]。值得注意的是,后两种方法都涉及了中胚层谱系定向分化。Adkar等^[13]通过一些细胞因子和化学分子等的调控作用,实现了iPSC向软骨细胞的转化,且该软骨细胞在体外成熟后还显示出一定的异质性。相比于体外实验,体内实验更能证实iPSC修复缺陷的能力。

大多数体内实验研究基本可以理解为iPSC在体外进行分化再移植到体内,目前较多使用的方法是通过培养EB的方式或利用其他刺激来改善特定胚层细胞,也可采用通过iPSC获取软骨细胞的方法,还可运用细胞支架以及化学试剂等。Zhu等^[14]通过诱导EB的形成使人类iPSC分化为软骨细胞并用于大鼠OA模型中,结果显示OA得到改善且有关节软骨基质生成。在此基础上,Rim等^[15]提出了使用编码骨形态发生蛋白(BMP)-2或转化生长因子(TGF)- β 3的微环载体,同样可将人类iPSC分化为软骨细胞,并导入大鼠模型中修复软

骨缺损,这样可降低EB方法的细胞培养成本。此外,有学者提出了在EB方法中添加Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂(Y27632),提高了EB方法的安全性,可在无血清条件下完成人类iPSC向关节软骨细胞分化,证明其具有应用于临床的潜力^[16]。

除了利用EB方法外,还有一种使人类iPSC转变为透明软骨的方法。在引入BMP-2、TGF- β 1和生长分化因子(GDF)-5等后,通过悬浮培养纯化并产生软骨颗粒,再将其移植到免疫缺陷小鼠和大鼠中,可发现表达II型胶原蛋白的透明软骨生成。Chang等^[17]建立了兔OA模型,通过移植iPSC进行治疗并评估其模型中获得的软骨细胞,发现分化的软骨细胞可在体内有效地修复OA导致的软骨损伤且具有抗炎、抗分解的作用。

近期在大鼠、小型猪、兔等动物上进行的相关体内实验大部分在体外实验的基础上完成。在不同的实验研究中,iPSC分化出的软骨细胞不论在治疗结果,还是在后期评估中都有不错的表现,且iPSC来源的细胞能够在体内再生透明软骨,表达II型胶原蛋白,这些也为今后运用于临床治疗提供了参考。

2 iPSC用于OA软骨再生治疗

在OA的软骨再生治疗中,iPSC常与MSC进行比较。在iPSC发现之前,MSC一直作为细胞治疗的首选,因为其可来源于多种组织、无伦理道德问题且有旁分泌的功能。但MSC增殖代数有限,难以获得满足组织工程技术的细胞用量。iPSC的出现恰恰可以弥补这一缺点,产生足量的MSC以达到对关节软骨的修复。而众多研究也表明,iPSC的衍生细胞体外软骨分化很成功,可生成II型胶原蛋白高表达的透明软骨且少出现细胞肥大^[18],与原生关节软骨细胞功能相似度极高。后期的体外实验还发现,细胞生长环境显著影响其向软骨细胞分化的效率^[19],三维培养方法可提高细胞在孵化期间的接触,在软骨形成中至关重要。

Yamashita等^[20]、Zhu等^[14]及Rim等^[21]将体外培养的iPSC衍生软骨细胞移植到OA动物模型体内,再对缺损部位的再生软骨进行评估,均证实了由iPSC分化产生的软骨细胞对体内软骨缺损的修复潜力。iPSC-MSC较其衍生的软骨细胞在移入体内后可获得更好的结果。Xu等^[22]以iPSC-MSC为基础,在实验中验证了iPSC具有修复体内软骨缺损的能力。

虽然 iPSC 的衍生细胞在体内均表现出不错的软骨再生潜能,且在多项研究中有半数以上未显示任何类型的畸胎瘤或肿瘤形成,但是应用于临床仍有诸多挑战。首先,是存在于软骨诱导的方法上,将 iPSC 与软骨细胞共培养,尽管软骨细胞分泌的细胞因子可使 iPSC 向软骨细胞分化,但获得的软骨细胞数量较少且太过依赖与此共培养体系。同样地,体外形成 EB 后获得的可产生软骨细胞的中胚层细胞不足,很难满足再生医学的需要,如何高效地取得分化良好的间充质细胞样细胞困扰着许多研究团队。其次, iPSC 来源影响着其软骨分化能力,相较于其他来源的 iPSC,脐带血单核细胞来源的 iPSC 分化后可表达更多的软骨特异性标记,但产生分化能力差异的原因至今未有研究探究,为临床试验增加了不确定因素。再者,全球 iPSC 库的开发正在进行,而缺乏统一药品生产质量管理规范(GMP)标准的鉴别方案(即鉴别是否为符合 GMP 级的用于临床治疗的 iPSC 衍生人体细胞的方案)是其应用障碍之一。iPSC 的遗传安全性问题也逐渐暴露出来,体细胞自身因素及培养 iPSC 的不同阶段均可导致遗传物质改变,这些遗传变异阻碍了它们在新疗法中的应用。

3 结语

尽管 iPSC 有诸多优点,其临床应用依然是漫长的过程,主要的限制原因是其致瘤性^[23-24]。iPSC 类似于 ESC,理论上可以分化为三胚层的任意细胞,因此具备在未分化状态下形成畸胎瘤的潜力。相信随着越来越多优秀的体内试验和诱导方案的建立, iPSC 向骨或软骨分化的技术也会日趋成熟。

参考文献

[1] Sherman SL, Thyssen E, Nuelle CW. Osteochondral autologous transplantation[J]. Clin Sports Med, 2017, 36(3): 489-500.

[2] Frehner F, Benthien JP. Microfracture: state of the art in cartilage surgery[J]. Cartilage, 2018, 9(4): 339-345.

[3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.

[4] Lach MS, Rosochowicz MA, Richter M, et al. The induced pluripotent stem cells in articular cartilage regeneration and disease modelling: are we ready for their clinical use?[J]. Cells, 2022, 11(3): 529.

[5] Abujarour R, Valamehr B, Robinson M, et al. Optimized surface markers for the prospective isolation of high-quality hiPSCs using flow cytometry selection[J]. Sci Rep, 2013, 3: 1179.

[6] Xu H, Wang B, Ono M, et al. Targeted disruption of HLA genes

via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility[J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(4): 566-578.

[7] 冯顶丽,卓丽丹,芦笛,等.人诱导多能干细胞体外多向分化能力的方法验证[J].武警医学,2019,30(4):303-307.

[8] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1061-1067.

[9] Rodriguez Ruiz A, Dicks A, Tuerlings M, et al. Cartilage from human-induced pluripotent stem cells: comparison with neo-cartilage from chondrocytes and bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. Cell Tissue Res, 2021, 386(2): 309-320.

[10] Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, et al. Characterization of mesenchymal stem cell-like cells derived from human iPSCs via neural crest development and their application for osteochondral repair[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 1960965.

[11] Kawata M, Mori D, Kanke K, et al. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds[J]. Stem Cell Reports, 2019, 13(3): 530-544.

[12] Ferguson GB, Van Handel B, Bay M, et al. Mapping molecular landmarks of human skeletal ontogeny and pluripotent stem cell-derived articular chondrocytes[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3634.

[13] Adkar SS, Wu CL, Willard VP, et al. Step-wise chondrogenesis of human induced pluripotent stem cells and purification via a reporter allele generated by CRISPR-Cas9 genome editing[J]. Stem Cells, 2019, 37(1): 65-76.

[14] Zhu Y, Wu X, Liang Y, et al. Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes[J]. BMC Biotechnol, 2016, 16(1): 78.

[15] Rim YA, Nam Y, Park N, et al. Chondrogenic differentiation from induced pluripotent stem cells using non-viral minicircle vectors[J]. Cells, 2020, 9(3): 582.

[16] Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(6): 638-645.

[17] Chang YH, Wu KC, Ding DC. Induced pluripotent stem cell-differentiated chondrocytes repair cartilage defect in a rabbit osteoarthritis model[J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 8867349.

[18] Ko JY, Kim KI, Park S, et al. In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(11): 3571-3581.

[19] Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, et al. Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: a review[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 5421019.

[20] Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs[J]. Stem Cell Reports, 2015, 4(3): 404-418.

[21] Rim YA, Nam Y, Park N, et al. Different chondrogenic potential among human induced pluripotent stem cells from diverse origin primary cells[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 9432616.

[22] Xu X, Shi D, Liu Y, et al. In vivo repair of full-thickness cartilage defect with human iPSC-derived mesenchymal progenitor cells in a rabbit model[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(1): 239-245.

- block and ultrasound-guided transverse abdominis plane block on intraoperative hemodynamics and perioperative analgesia in abdominal bone flap cranioplasties: a prospective, randomized, double-blinded study[J]. *J Neuroanaesth Crit Care*, 2019, 6(1): S15.
- [13] Halim NA, Chistol I, Tan Z, et al. GP62 Lignocaine toxicity: a case report of adverse effect of local anaesthesia in community setting[J]. *Arch Dis Child*, 2019, 104(Suppl 3): S54-S55.
- [14] Lee S, Hwang JM, Lee S, et al. Implementation of the obturator nerve block into a supra-inguinal fascia iliaca compartment block based analgesia protocol for hip arthroscopy: retrospective pre-post study[J]. *Medicina(Kaunas)*, 2020, 56(4): 150.
- [15] Li J, Dai F, Chang D, et al. A practical analgesia approach to fragility hip fracture: a single-center, retrospective, cohort study on femoral nerve block[J]. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(4): 175-179.

(收稿时间 : 2023-04-07)

(本文编辑 : 杨晓娟)

(上接第 320 页)

- [23] Gorecka J, Kostiuik V, Fereydooni A, et al. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 87.
- [24] Mitchell A, Wanczyk H, Jensen T, et al. Assessment of iPSC teratogenicity throughout directed differentiation toward an alveolar-like phenotype[J]. *Differentiation*, 2019, 105: 45-53.

(收稿日期 : 2023-03-14)

(本文编辑 : 卢千语)