

人羊膜间充质细胞分离培养及其干细胞特性研究*

李海建^{1,2} 张广静² 江 兰^{1,2} 余春艳^{1Δ} 金 岩^{2Δ}

(1 第四军医大学唐都医院皮肤科 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学组织工程研发中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究人羊膜间充质细胞(Human amniotic mesenchymal cells,HAMCs)的分离、培养及其干细胞特性,为羊膜间充质细胞在再生医学的潜在应用奠定实验基础。方法:无菌条件下取正常足月剖腹产胎儿的羊膜剪成碎片,经胰酶胶原酶序贯消化,DMEM/F12 培养,倒置显微镜下观察其形态,MTT 法检测其生长规律,免疫荧光的方法对细胞进行鉴定,定向诱导方法检测细胞的多向分化潜能。结果:来源于羊膜的间充质细胞,细胞免疫荧光显示 SSEA-4,OCT-4 阳性,具有很强的增殖能力,并且具有一定的多向分化能力,在特定条件下可分化为脂肪细胞和成骨细胞;结论:羊膜间充质细胞能够在体外分离、培养、扩增,并且具有干细胞特性。羊膜间充质细胞在再生医学和组织工程应用有很好的前景。

关键词:羊膜间充质细胞;细胞培养;干细胞;组织工程

中图分类号:Q75,Q813,R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)02-227-03

Study on isolation and culture of human amniotic mesenchymal cells and its stem cells characteristics*

Li Hai-jian^{1,2}, Zhang Guang-jing², JIANG Lan^{1,2}, YU Chun-yan^{1Δ}, JIN Yan^{2Δ}

(1.Department of Dermatology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China;

2 Research and Development Center for Tissue Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the isolation, culture and stem cells characteristics of human amniotic mesenchymal cells (HAMCs) for its potential application in regenerative medicine. **Methods:** Term placentas from healthy donor mothers obtained from caesarean sections were minced under sterile conditions. After sequential trypsin and collagenase digestion, cultivated in DMEM/F12, the morphology of HAMCs was observed under the microscope. Growth regularity was observed by MTT assay, the cell was identified by immunofluorescence, and it has multi-potential ability under specific conditions. **Results:** Mesenchymal cells derived from human amnion membrane, SSEA-4 and OCT-4 positive by immunofluorescence, It displays a strong proliferation and multipotential capacity. The cells can differentiate into fat cells and osteoblasts. **Conclusions:** HAMCs can isolation, culture and amplification in vitro, and these cells have stem cell properties. HAMCs has good prospects applications in regenerative medicine and tissue engineering.

Key words: Human amniotic mesenchymal cells; Cell culture; Stem cells; Tissue engineering

Chinese Library Classification (CLC): Q75, Q813, R318 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-227-03

前言

人羊膜是来源于胎儿的胚胎早期产物,羊膜细胞包括羊膜上皮细胞和羊膜间充质细胞,从胚胎发育的角度来看,人羊膜上皮细胞来源于受精后第8天的胚胎外胚层,羊膜间充质细胞来源于原条的胚外中胚层^[1]。近年来,有越来越多的学者关注于人羊膜间充质细胞,其中 In't Anker 等^[2]从羊膜培养出 MSCs,经免疫表型鉴定与骨髓来源的 MSCs 相似,且其比骨髓来源的 MSCs 具有更强的扩增能力。Francesco Alviano 等证明羊膜间质干细胞在体外可以诱导分化为脂肪细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、神经细胞、内皮细胞和心肌细胞^[3]。这些研究提示,人羊膜组织含有干细胞样细胞。从羊膜分离、培养干细胞,因其

来源广泛,不受伦理限制等优越性而具有广阔的应用前景,有望成为再生医学领域的可靠细胞。然而,目前国内对羊膜间充质细胞的生物学特性研究还比较少,为此,作者进行了人羊膜间质细胞的分离、培养及鉴定,并在体外研究其干细胞特性。

1 资料与方法

1.1 实验材料,主要试剂和仪器

足月正常妊娠产妇剖宫产羊膜,取于第四军医大学西京医院妇产科。DMEM/F12 培养基,胰酶,I 型胶原酶(均购自美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青应用研究所),碱性成纤维生长因子(bFGF),单抗 SSEA-4(Bio),OCT-4(Bio);

* 基金项目:国家“863 计划”组织工程皮肤重大专项资助项目(2002AA205041,2005AA205241)

作者简介:李海建(1981-),男,硕士研究生,医师,研究方向:组织工程;电话:15191570420,

Email:haijianlixn@163.com

Δ通讯作者:余春艳,教授,硕士研究生导师;E-mail:yucy2003@yahoo.com.cn

金岩,教授,博士研究生导师;E-mail:yanjin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-12 接受日期:2010-11-08)

罗丹明标记山羊抗小鼠荧光二抗; β -磷酸甘油钠,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBM),地塞米松,胰岛素,抗坏血酸(均购自Sigma公司),Power-wave XS 酶联免疫测定仪(BiTek,美国),荧光显微镜(Olympus)

1.2 羊膜间质干细胞的分离培养,原代及传代

无菌条件下取剖宫术中的胎膜组织,钝性分离胎盘脐带面的羊膜约 $8 \times 10 \text{ cm}$,用 PBS 缓冲液充分冲洗去除细胞碎片、血液。用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 15 分钟,重复 2 次,弃除羊膜上皮细胞,将剩余羊膜组织充分切碎,加入终浓度 1.0 g/L 的胶原酶 37°C 消化 120 min,过不锈钢网将消化下来的细胞制成单细胞悬液, 800 r/min 离心 5 min 收集细胞,苔盼蓝染色,计数活细胞,以 $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 接种于 75 ml 培养瓶内。培养基采用 VDMEM:VF12 为 1:1 的 DMEM/F12 加体积分数为 10% 的胎牛血清(FBS)、 $20 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维生长因子(bFGF),置于 37°C 、饱和湿度、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养 48~72 h 后,更换培养液,弃去未贴壁的细胞,根据细胞生长情况,每 3~4 d 全量换液 1 次。待细胞达到 80%~90% 融合时,用 2.5 g/L 的胰酶消化传代。

1.3 MTT 比色法检测细胞的增殖

收集第 2 代对数生长期的细胞,调整细胞密度为 1×10^3 个/ml,接种于 96 孔板, $200 \mu\text{l}$ /孔,常规培养,共 8 组,每组 6 个复孔置细胞培养箱连续培养 8 d,每 3 d 换液 1 次从接种后的第二天起,每天同一时间取 6 孔,每孔加入 MTT (5 g/L) $20 \mu\text{l}$,避光培养 4 h 后吸弃孔内上清,加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪测定波长 490 nm 时每孔的光吸收值(OD),求均值。连续检测 8 d,设空白为对照,以时间为横轴,光吸收值为纵轴,绘制细胞生长曲线。

1.4 免疫荧光检测 SSEA-4 OCT-4

SSEA-4, OCT-4 是胚胎干细胞表面的重要标记物。取对数生长第 3 代细胞,用 0.25% 胰蛋白酶液消化,制成单细胞悬液。将细胞接种到预先放置 $1 \times 1 \text{ mm}$ 盖玻片的 24 孔培养板里培养 1 天至 3 天,取出盖玻片,浸入 PBS 洗 2 次,冷丙酮固定 10 min。分别选择单克隆鼠抗人 SSEA-4(Bio),OCT-4(Bio) 做为一抗,用罗丹明标记山羊抗小鼠荧光二抗,荧光显微镜下观察结果,阳性部分为红色荧光,空白对照均用 PBS 代替一抗。

1.5 HAMCs 成骨成脂能力

取生长状态良好的第 3 代 HAMCs,以 2×10^4 个/ml 接种于 12 孔板内,24 小时后分别换用成脂,成骨诱导液。成脂诱导液:基础培养液 + 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBM) + 1 mol/L 地塞米松 + 10 mg/L 胰岛素 + 200 mol/L 吡哆美辛,成骨诱导液:基础培养液 + 0.1 mol/L 地塞米松 + 50 mg/L 抗坏血酸 + 10 mmol/L 磷酸甘油钠 诱导液每 3 天换液一次,定期观察细胞形态变化,成脂培养 3 周对细胞进行油红 O 染色,成骨培养 4 周进行茜素红染色。

2 结果

2.1 HAMCs 一般生长状态

原代细胞接种 24 h 后细胞开始贴壁生长,24-72 h 后镜下见细胞呈集落生长,呈成纤维样,少数小多角形,4 d 后贴壁生长的细胞数量明显增多,集落之间逐渐汇合,6-7 d 细胞已大部

分汇合,达培养瓶底面积的 70~80% 传代 传代细胞与原代的细胞的形态相似,细胞贴壁快,接种 4 h 后细胞基本贴壁,原代和第 1 代细胞含有少量的羊膜上皮细胞,传代后消失,3 代以后细胞纯度好 各代细胞形态无明显变化。(图 1A B)

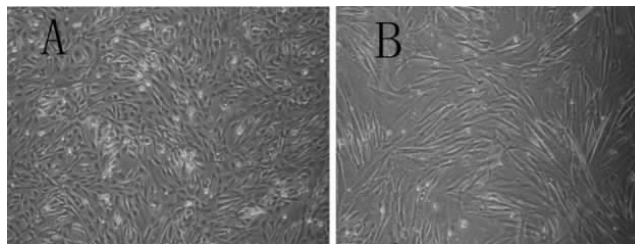


图 1 A 为原代 HAMCs, B 为第 14 代 HAMCs (x 40)

Fig1 A: P_0 HAMCs, B: P_{14} HAMCs (x40)

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖并绘制生长曲线

MTT 检测结果显示,培养的细胞增殖能力强,无明显的生长停滞期,第 2 d 进入对数生长期,第 7 d 达到生长峰值,之后进入平台期(图 2)

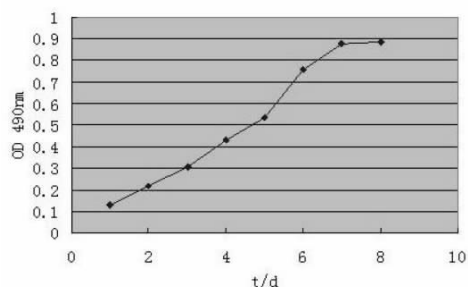


图 2 P_2 HAMCs 的生长曲线

Fig 2 Growth curve of P_2 HAMCs

2.3 HAMCs 表达干细胞表面标记物

免疫荧光显示羊膜间质细胞 SSEA-4, OCT-4 均有阳性表达。荧光显微镜下观察, SSEA-4 (图 3A), OCT-4 (图 3C) 阳性部分为红色荧光,而各自空白对照组无红色荧光(图 3B, D)。

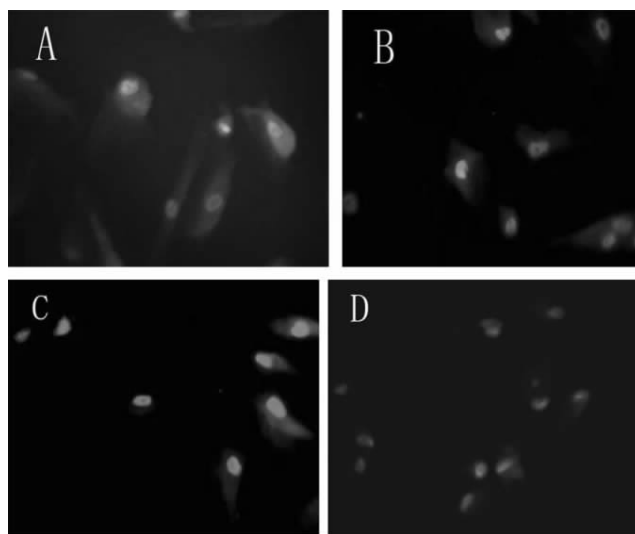


图 3 示 HAMCs 免疫荧光染色 A, C 分别为 SSEA-4, OCT-4, 均阳性表达, 为红色荧光染色, B, D 为各自对照组, 无红色荧光(x200)

Fig3 Immunofluorescence of HAMCs A, C: SSEA-4 OCT-4 are positive, red fluorescent staining. B, D are control groups, without red fluorescent staining (x200)

2.4 成脂 成骨诱导

羊膜间充质细胞经成脂诱导液培养后细胞增值速度变慢,胞体变大,连续诱导 7 d,胞浆内开始出现脂滴,随着诱导时间延长,含脂滴的细胞增多,胞内脂滴可互相融合增大,连续诱导 21 d,大部分细胞出现了脂滴,油红 O 染色呈桔红色(图 4A) 对照组细胞增值速度和形态无明显变化,细胞内无脂滴出现(图 4B)。成骨诱导液培养细胞后,细胞增值速度仍保持较快,重叠生长,细胞由长梭形变为短梭形,分泌大量细胞外基质,诱导 2 周后在细胞密集区域出现钙盐沉积,形成大小不等的特征性的矿化结节,随着诱导时间延长,细胞继续增长聚集,矿化结节增多。诱导 4 周后,4 %多聚甲醛固定细胞,茜素红染色,形成的矿化结节呈深红色(图 5 A) 未诱导的细胞无矿化结节形成。(图 5B)

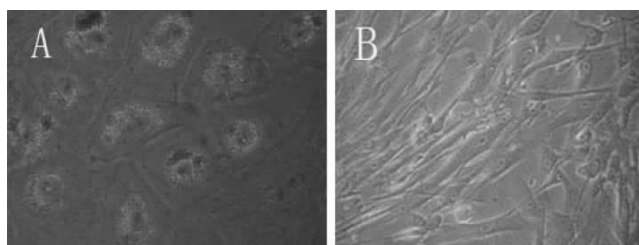


图 4 A 图示 P₃ HAMCs 成脂诱导 3W,油红 O 染色脂滴呈桔红色, B 图示未经诱导的细胞内无脂滴出现(x200)

Fig4 A:After HAMCs are cultured in adipogenic medium for 3 weeks, lipid droplets shows orange after oil red O stain.B:No lipid droplets in cells without cultured in adipogenic medium(x 200)

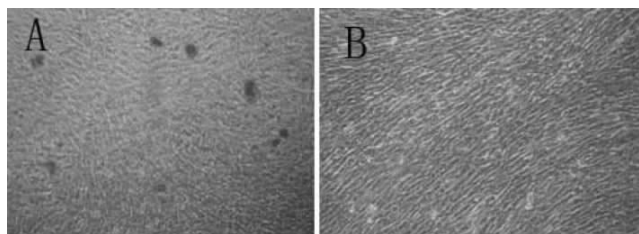


图 5 A 图示 P₃ HAMCs 成骨诱导 4W,茜素红染色,矿化结节呈深红色, B 图示未经诱导的细胞无矿化结节形成(x 100)

Fig 5 A: HAMCs are cultured in Osteogenic medium for 4 weeks, Mineralization nodes shows deep red after alizarin red stain.B: No mineralization nodes show without cultured in Osteogenic medium(x 100)

3 讨论

间质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是来源于成熟组织中的多能干细胞,具有高度自我更新能力和多向分化潜能,是细胞移植和组织工程的理想种子细胞。目前已在多种组织中成功分离培养出间质干细胞,比如骨髓基质干细胞(MSCs)肌肉源性干细胞(MDSCs)脂肪组织来源干细胞(ADSCs)等^[4]。羊膜间质细胞(HAMCs)不但具有干细胞特征,而且相比其他间质干细胞,具有来源广泛,分离培养容易,增殖快,不受伦理学限制等优越性,因而其应用前景更为广泛。

我们实验研究发现,羊膜间质细胞容易分离培养,15 代以前细胞形态均一,成纤维细胞样。通过生长曲线可以看出, HAMCs 增殖旺盛,无明显的生长滞缓期,第 2 d 开始就进入对数生长期,第 7 d 达到生长高峰,第 8 d 后进入平台期。羊膜间质

细胞表达胚胎干细胞表面标记物 SSEA-4、OCT-4, 而 OCT-4 被认为是多能干细胞自我更新和多项分化潜能的基因^[5]。进行定向诱导并检测是文献报道常用的鉴定干细胞的方法^[6], 本实验通过对细胞的成脂成骨诱导, 证明了其具有定向分化的能力, 经成骨诱导的细胞出茜素红染色阳性, 经成脂诱导的细胞油红染色阳性。

进一步研究还发现, HAMCs 表达 HLA-A、B 和 C, 不表达 HLA-DR, 弱阳性表达 HLA-G^[7] Wolbank^[8] 等还发现, 羊膜细胞能够抑制激活的外周血单核细胞(PBMCs)的增殖, 而且这种抑制作用呈一定的剂量依赖性。HAMCs 和 HAECs 可显著地抑制混合淋巴细胞反应中 PBMCs 增殖, 抑制效率分别为 34 %和 23 %。

Pan HC^[9]等应用羊膜来源间充质细胞移植治疗 SD 大鼠坐骨神经损伤 步态分析结果显示移植治疗组的肌肉复合动作电位的波幅百分比为 43% 对照组为 29% 动作电位传导伏期分别为 1.7ms 和 2.5ms 表明移植组治疗效果优于对照组。这揭示了羊膜间充质细胞在临床中有一定潜在应用价值。

HAMCs 不但具有干细胞特征, 而且表现出低免疫源性和免疫抑制作用, 是较为理想的免疫赦免细胞, 为各种疾病的细胞替代治疗提供了新选择。羊膜已经用于治疗化学或热烧伤以及眼科疾病, 如角膜溃疡和翼状胬肉, 并且是一种易于获取、产量高、无伦理学限制的再生医学细胞来源, 在皮肤创面愈合, 骨重塑、肝脏再生、心肌修复和神经重建中有潜在的应用价值。

参考文献(References)

- [1] Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al. Human amnion mesenchymal cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells [J]. J Neurosci Res, 2004;78(2):208-14
- [2] In 't Anker PS, Scherj on S A, Kleijburg - van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta [J]. Stem Cells, 2004, 22 (7) : 1338-1345
- [3] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro [J]. BMC Developmental Biology, 2007, 7:11
- [4] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V, et al. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2008,8:726-736
- [5] Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells[J]. Mol Cell Biol. Mar, 2002;22(5):1526-1536
- [6] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005,54:132-141
- [7] Moon J H, Lee J R, Jee BC, et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells [J]. Hum Reprod, 2008, 23 (8): 1760 -1770
- [8] Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue [J]. Tissue Eng, 2007, 13 (6) : 1173 -1183
- [9] Pan HC, Yang DY, Chiu YT, et al. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell [J]. J Clin Neurosci, 2006,13(5):570-575