· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.040

人羊膜间充质干细胞的临床前研究进展*

张递思¹综述, 史明霞^{1△}, 董 坚²审核

(昆明医科大学第一附属医院: 1. 血液科; 2. 肿瘤内科, 昆明 650032)

[关键词] 间质干细胞; 羊膜; 生物学特性; 临床前研究

[中图分类号] R321

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)09-1268-03

羊膜位于胎盘的最内层, 主要由来源于外胚层的上皮细胞和来源于中胚层的间充质细胞构成。其不含血管, 细胞成分相对简单, 在胎儿娩出后即成为“废弃物”。人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)有着来源丰富、无需有创操作、取材几乎不受限制、分离培养方法简便、有向 3 个胚层来源的组织细胞分化的潜能、免疫原性低等多种优点, 可能成为一种更加理想的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)临床研究及应用的来源^[1]。

1 hAMSCs 的生物学特性

1.1 免疫表型及基因表达 目前, hAMSCs 还没有统一的表面标志物, 但是大多数表面抗原和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)相似。Kim 等^[2]通过分离羊膜间充质细胞并在体外扩增至第 2、3 代后获得成纤维样细胞, 通过不同的培养条件分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、神经元细胞。免疫表型分析结果显示, 其表达 SSEA-3、SSEA-4、胶原蛋白-I、-II、-III、-IV、-VII、纤维连接蛋白、 α -SMA、波形蛋白(Vimentin)、结蛋白、细胞角蛋白 18(CK18)、HCAM-1、成纤维细胞表面蛋白和人类白细胞抗原(HLA)-ABC; 弱表达 ICAM-1 蛋白; 不表达 TRA-1-60、VCAM-1、vWF、PECAM-1 和 HLA-DR。用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测发现无论传至几代, 一些基因[如: Oct-4、Rex-1、SCF、神经细胞黏附分子(nerve cellular adhesion molecule, NCAM)、巢蛋白(Nestin)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)4、心肌特异性转录因子 GATA-4、肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)-4 α 、波形蛋白(Vimentin)、CK18]始终持续表达。而一些基因(如: 鼠短尾突变体表型、*FGF-5*、*Pax-6* 和 *BMP2*)不表达。其中, 研究发现, α -甲胎蛋白、HLA-ABC、HLA-DR 基因表达于早期(2~3 代)的细胞中而不表达于晚期(7~13 代)的细胞中, 且在第 3 代以上的细胞中可检测出端粒酶活性。近年来, 流式细胞仪分选干细胞侧群技术广泛应用于提取多分化潜能干细胞。朴正福等^[3]利用流式细胞分选技术 hAMSCs 中分离提纯干细胞(hAMC-SP 细胞), 通过 FACS 分析结果示, 此细胞表达 Nestin、Vimentin、整合素家族成员(CD49b、CD49c、CD49d、CD49e)、CD9、CD13、CD19、CD29、CD44、CD46、CD51、CD59、CD166 及干细胞相关的 Oct-3/4 抗原。HLA-ABC、TRA-1-81 及 SSEA-4 为弱表达; CD34、CD45、CD117、CD56、CD90、CD105、CD106、CD133、Fit1、Musashil 及 HLA-DR 无阳性结果, TRA-1-60 及 SSEA-3 也表达阴性。实验结果提示此细胞与其他间充质干细胞一样, 不表达造血干细胞标记, 表达整合素分子成员及间充质干细胞特征性表面标志蛋白。

1.2 增殖能力、免疫原性及致瘤性 SSEA-3、SSEA-4 是胚胎干细胞和胚胎生殖细胞的表面标志特征, 成体干细胞包括 BMMSCs 无表达。研究发现羊膜间充质细胞表达 SSEA-3、SSEA-4, 说明 AM-MSCs 可能是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间的一个中间等级的干细胞, 因此, 其增殖能力比 BM-MSCs 更强。同时发现传至(14.5 $\pm$ 0.9)代、培养(146.8 $\pm$ 8.9)d 后、群体倍增平均数(36.9 $\pm$ 4.7)后细胞衰老^[2]。

人羊膜细胞的低免疫原性和人羊膜组织移植不易引起免疫排斥反应。有学者通过实验发现将 AM-MSCs 与人外周血单个核细胞(PBMC)或纯化的 T 细胞直接 transwell 共培养都可以抑制同种异体混合淋巴细胞反应诱导的淋巴细胞增殖, 随着 AM-MSCs 细胞的增多, 其抑制效应越明显, 当细胞比例达到 1:1 时, 抑制效应最强。近来有学者进一步研究表明 hAM-SCs 通过分泌可溶性因子在抑制淋巴细胞增殖中起作用, 其中前列腺素可能是关键的效应分子。并且首次证实了 hAMSCs 抑制淋巴细胞增殖的能力是其本身所具有的, 而不是像 BM-MSCs 抑制淋巴细胞增殖需要活化刺激等条件^[4-5]。近来研究报道, 采用原代或第 1~3 代的间充质干细胞进行治疗, 不会有致瘤的危险。而目前对于 hAMSCs 的致瘤性问题, 国内外的研究均较少。朴正福等^[3]通过在体外进行癌化实验, 提示 hAMSCs 传代培养时保持细胞原有的特性, 不具有致瘤性。利用体外细胞集落分析方法对 hAMSCs 的致瘤性进行了简单的研究, 发现 AMC-SP 细胞未形成集落, 而作为阳性对照的 HepG2 形成了多数较大集落。

2 hAMSCs 的临床前研究

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多系分化能力的细胞群体, 是替代、修复或加强受损或衰老组织、器官功能的理想种子细胞, 是组织工程再生医学领域的重要生物材料来源。hAMSCs 能分化为多种细胞, 且因其自身的诸多优势, 使其在再生医学应用中具有很高的应用价值。近年来已有不少学者对其做了许多临床前的探索研究。

有研究证实羊膜间充质干细胞可促进人脐血单个核细胞和 CD34⁺ 细胞扩增, 扩增后两者在甲基纤维素半固体培养基中能够形成造血祖细胞集落, 其造血支持作用与 BM-MSCs 相似, 二者比较差异无统计学意义^[6]。最近有学者首次使用 hAMSCs 移植治疗大剂量顺铂诱导的骨髓抑制, 发现 hAMSCs 移植治疗较早地改善顺铂所致骨髓抑制小鼠的造血功能^[7]。

Kim 等^[8]发现 hAMSCs 较脂肪来源的间充质干细胞表达更高水平的血管内皮生长因子-A、血管生成素-1、肝细胞生长因子、纤维母细胞生长因子-2(FGF-2), 特别是抗凋亡因子(Akt-1)也在 hAMSCs 中高表达。进一步研究发现, 当移植

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260232); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金资助项目(2010CI013); 云南省科技厅昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(2012FB031)。 作者简介: 张递思(1988-), 硕士, 主要从事成体干细胞生物学特性及临床应用研究。 △ 通讯作者, Tel: (0871)65324888-2529; E-mail: shmxia2002@sina.com。

hAMSCs 入小鼠缺血性后肢中,观察到其自发的形成血管样结构以及表达特定的内皮基因和蛋白。移植 hAMSCs 后增强血液灌注及毛细血管密度,表明 hAMSCs 能增加新血管形成,且实验证实其移植率高。以上说明移植 hAMSCs 在治疗缺血性下肢中可能具有可观的疗效。Warrier 等^[9]采用逆转录 PCR (RT-PCR)、免疫组织化学法等方法显示羊膜来源的间充质干细胞在体外有生成内皮和血管的能力。进一步研究证实其本身表达促血管生成因子(如:Tie2、Ang1、VEGF、VEGFR、vWF、KDR 和 Flt4)。这表明可将其应用于创伤愈合、中风、缺血性疾病和组织修复中。Kim 等^[10]和 Fatmah 等^[11]采用糖尿病的 NOD/SCID 小鼠模型,也证实了羊膜间充质干细胞通过分泌血管新生因子和增强移植分化能力,促进伤口愈合。最近有学者发现连续传代培养后羊膜间充质干细胞对血管生成素-1 的表达增强。因胎儿的创伤愈合需要最小的炎症反应和有限的疤痕,Klein 等采用胎羊羔模型发现,虽 hAMSCs 不是创伤愈合过程中绝对必需的,但其能加快创伤闭合,增加伤口处的细胞外基质。而对其中转化的影响还需进一步研究。

近来有研究发现 hAMSCs 在体外经自然生物诱导剂 RPE (老鼠再生胰腺提取物)诱导可分化为分泌胰岛素的细胞^[12]。也有学者通过实验观察到羊膜间充质干细胞能形成胰岛样细胞团(ILC),采用免疫组织化学法显示已分化的 ILC 可表达人胰岛素、胰高血糖素、生长抑素。而实时定量 PCR 显示除表达人胰岛素、胰高血糖素、生长抑素,还表达 Ngn3、Isl1。将其移植入实验性糖尿病小鼠,可使小鼠恢复正常的血糖且没有免疫排斥^[13]。以上说明羊膜间充质干细胞具有形成新生胰岛的能力,使其可能用于细胞替代治疗糖尿病。

hAMSCs 也能分化为神经元细胞。有研究证实将经 BHA 诱导的 hAMSCs 移植入小鼠局灶缺血模型(此模型有不同程度的左侧偏瘫伴随右侧霍纳氏综合征),分别于 1、3、6、8 周后检查,发现与对照组比较,移植组小鼠的神经系统症状有明显的改善。且移植入小鼠体内的 hAMSCs 主要集中于移植部位及其周边区域,而在某些特定的情况下,其向缺血部位迁移。未检测到缺血部位的胶质增生及淋巴细胞浸润。以上实验说明,用 BHA 诱导过的 hAMSCs 能分化为表达 NSE 的神经元样细胞。此外,hAMSCs 移植可能改善局灶性脑缺血后造成的神经系统症状^[14-15]。近来以大鼠为模型研究发现 hAMSCs 能显著改善脑缺血大鼠的行为障碍、减少脑梗死体积及提高功能恢复。将 hAMSCs 移植入阿尔茨海默病老鼠中,发现其通过免疫调节及旁分泌机制持久地改善了老鼠的记忆功能^[16]。Paracchini 等研究发现羊膜间充质干细胞有可能分化为与囊胞性纤维症(CF)发病相关的器官(肝与肺)的上皮细胞,并能有助于部分修复 CF 的表型。有研究表明,hAMSCs 能分化为心肌细胞,且能高效率地重组成为诱导性多能干细胞(MiPSCs),由 MiPSCs 分化得来的心肌细胞表达 c-kit 细胞的表面标志,其能纯化心肌细胞群且能用于同种异体的心脏干细胞疗法^[17-18]。最近研究发现三维培养系统能增加 hAMSCs 分化为心肌样细胞,使其能更有效地应用于再生医学^[19]。还有学者通过将羊膜间充质干细胞直接移植入心肌梗死的 NOD/SCID 小鼠模型中的缺血心肌组织的周边,发现羊膜间充质干细胞能显著表达相关的趋化因子及其受体,并改善了心脏功能,这一试验表明了将羊膜间充质干细胞应用于缺血性心血管病的治疗的可能性^[20]。

有学者建立有气管缺陷的胎儿羊羔模型,发现移植羊膜间充质干细胞能增加其气管的修复,表明了将来应用于围产期儿气道修复的可能性^[21]。在博来霉素诱发的肺损伤活体模型中研究中发现,hAMSC 能减轻肺纤维化、炎症反应,以及恢复肺

的通气功能。

近来有学者用载有 hAMSCs 的羊膜直接移植到有皮肤伤口的小鼠模型中,发现其通过促进表皮干细胞和毛细血管的再生促进皮肤愈合^[22]。也有学者用 hAMSCs 与 hAECs 细胞构建双层膜结构的皮肤组织,发现其与人皮肤组织有相似的形态,拥有表皮和真皮,且能成功修复无胸腺小鼠的全层皮肤缺损^[22]。

在移植 hAMSCs 入四氯化碳诱导的小鼠肝硬化模型中实验中,发现其能减少肝细胞凋亡,促进肝细胞再生,改善肝的纤维化^[23]。这为临床提供了一种治疗肝纤维化疾病的新方法。

Lange-Consiglio 等^[24]首次比较了羊膜间充质干细胞与 BM-MSCs 在治疗马的肌腱、韧带损伤的疗效,结果发现羊膜间充质干细胞的疗效优于 BM-MSCs。还有学者研究证实 BM-MSCs 的一些治疗应用可被羊膜间充质干细胞等其他来源的间充质干细胞所取代,包括移植抗宿主病的治疗^[25]。

Han 等^[26]通过流式细胞分析发现表达于女性生殖系统及妊娠子宫中的 *HOXA9*、*HOXA10*、*HOXA11* 基因也表达于羊膜来源的间充质干细胞上,并通过相关实验推断其可能作为子宫干细胞疗法的新来源。

Sakuragawa 等发现羊膜间充质干细胞表达神经胶质祖细胞的表型。最近又有研究证实 hAMSCs 有可能应用于神经胶质瘤的治疗。

3 展 望

hAMSCs 具有取材方便、来源广泛、不易受污染、几乎不存在伦理学争议、分离培养方法简单、免疫原性低、细胞增殖能力强、强分化潜能等众多优越性,使其在再生医学应用中具有良好的应用前景。但目前仍有许多需要解决的问题:(1)hAMSCs 的分离纯化技术还有待提高;(2)hAMSCs 的准确鉴定方法还有待研究;(3)hAMSCs 在体内存活、迁移、分化的机制仍需进一步的探索研究;(4)hAMSCs 在体内成瘤性方面的研究还很少。相信随着对 hAMSCs 更加深入的研究,未来必定能充分发挥 hAMSCs 的优势,将其广泛应用于临床上的治疗。

参考文献

- [1] Parolini O, Caruso M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update[J]. *Placenta*, 2011, 32(Suppl 2): S186-195.
- [2] Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells[J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(4): 581-594.
- [3] 朴正福, 张海燕, 丁淑芹, 等. 人羊膜间充质干细胞的生物学特性鉴定[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2010, 33(3): 157-162.
- [4] Rossi D, Pianta S, Magatti M, et al. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity[J]. *PloS One*, 2012, 7(10): e46956.
- [5] Kang JW, Koo HC, Hwang SY, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Vet Sci*, 2012, 13(1): 23-31.
- [6] 章守琴, 李维佳, 史明霞, 等. 人羊膜间充质干细胞支持造血的体外实验[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(49): 9235-9238.
- [7] 姚观平, 余丽梅, 范振海, 等. 人羊膜间充质干细胞移植骨髓抑制小鼠的造血功能[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(23): 4248-4255.

- [8] Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia [J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(3): 525-534.
- [9] Warriar S, Haridas N, Bhone R. Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue [J]. Placenta, 2012, 33(10): 850-858.
- [10] Kim SW, Zhang HZ, Guo L, et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities [J]. PloS One, 2012, 7(7): e41105.
- [11] Fatimah SS, Tan GC, Chua K, et al. Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells [J]. Microvasc Res, 2013, 86: 21-29.
- [12] Zhang Y, Wang D, Zeng H, et al. Differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells induced by regenerating pancreatic extract [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2012, 28(2): 214-221.
- [13] Kadam SS, Sudhakar M, Nair PD, et al. Reversal of experimental diabetes in mice by transplantation of neo-islets generated from human amnion-derived mesenchymal stromal cells using immuno-isolatory macrocapsules [J]. Cytotherapy, 2010, 12(8): 982-991.
- [14] Li F, Miao ZN, Xu YY, et al. Ransplantation of human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of focal cerebral ischemia [J]. Molecular Med Rep, 2012, 6(3): 625-630.
- [15] Kim KS, Kim HS, Park JM, et al. Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model [J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(10): 2408-2420.
- [16] Ge X, Wang IN, Toma I, et al. Human amniotic mesenchymal stem cell-derived induced pluripotent stem cells may generate a universal source of cardiac cells [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(15): 2798-2808.
- [17] Otaka S, Nagura S, Koike C, et al. Selective isolation of nanog-positive human amniotic mesenchymal cells and differentiation into cardiomyocytes [J]. Cell Reprogram, 2013, 15(1): 80-91.
- [18] Lin X, Li HY, Chen LF, et al. Enhanced differentiation potential of human amniotic mesenchymal stromal cells by using three-dimensional culturing [J]. Cell Tissue Res, 2013, 352(3): 523-535.
- [19] Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(2): 1062-1069.
- [20] Gray FL, Turner CG, Ahmed A, et al. Prenatal tracheal reconstruction with a hybrid amniotic mesenchymal stem cells-engineered construct derived from decellularized airway [J]. J Pediatr Surg, 2012, 47(6): 1072-1079.
- [21] Huo SZ, Shi P, Pang XN. Effect of the human amniotic membrane loaded with human amniotic mesenchymal stem cells on the skin wounds of SD rats [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2011, 33(6): 611-614.
- [22] Li H, Chu Y, Zhang Z, et al. Construction of bilayered tissue-engineered skin with human amniotic mesenchymal cells and human amniotic epithelial cells [J]. Artif Organs, 2012, 36(10): 911-919.
- [23] Zhang D, Jiang M, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse [J]. PloS One, 2011, 6(2): e16789.
- [24] Lange-Consiglio A, Tassan S, Corradetti B, et al. Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries [J]. Cytother, 2013, 15(8): 1011-1020.
- [25] Manochantr S, Kheolamai P, Rojphisan S, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord [J]. Int Med J, 2013, 43(4): 430-439.
- [26] Han K, Lee J, Kwon S, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy [J]. Cell Prolif, 2008, 41(5): 709-725.

(收稿日期: 2014-10-25 修回日期: 2014-12-19)

• 综 述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.041

microRNA 在心律失常中的作用*

郭鑫综述, 杨俊[△]审校

(三峡大学心血管病研究所/三峡大学第一临床医学院心内科, 湖北宜昌 443000)

[关键词] 微RNAs; 心律失常; 心性; 离子通道; 心电传递

[中图分类号] R541.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)09-1270-03

microRNA(miRNA)是一种进化高度保守的内源性非编码单链RNA,在调控基因表达过程中发挥重要作用,广泛参与

心血管疾病的发生、发展^[1-2],调控心肌细胞的增殖分化、心肌收缩及心电传导等。研究发现,miRNA通过影响离子通道基

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170133,81200088)。

作者简介:郭鑫(1988-),在读硕士,主要从事临床冠心病研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13972561866; E-mail: yangjun@medmail.com.cn。