

人羊膜间充质干细胞的分离与鉴定^{*}

崔冬冰¹, 何志旭^{1,2*}, 李永念^{3,4}, 舒莉萍^{1,4,5}, 王黎龙¹

(1. 贵阳医学院 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 儿科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院 临床医学学院, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵阳医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 5. 贵阳医学院 实验动物中心, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨从人胎盘组织中分离羊膜间充质干细胞(hAMSCs)。方法: 收集剖宫产足月胎儿胎盘, 采用组织块贴壁法分离出羊膜间充质干细胞并传代培养, 对 P1-P3 代细胞进行细胞形态的观察, 用流式细胞仪检测细胞膜表面阳性分子 CD73-APC、CD90-FITC、CD44-PE、CD105-Cy5.5 和阴性分子 CD11b-PE、CD19-PE、CD34-PE、CD45-PE、HLA-DR-PE, 并采用六孔板法检测细胞增殖情况。结果: hAMSCs 的细胞形态呈成纤维状, hAMSCs 在培养 3~6 d 达到对数增长期, 通过流式检测, 发现细胞可表达 CD73、CD90、CD44 和 CD105, 未表达 CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR。结论: 从体外成功分离培养出人羊膜间充质干细胞。

[关键词] 干细胞; 细胞培养; 胎盘; 羊膜间充质干细胞; 分离与鉴定

[中图分类号] R34-32 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)01-0008-04

Isolation and Identification of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells

CUI Dongbing¹, HE Zhixu^{1,2}, LI Yongnian^{3,4}, SHU Liping^{1,4,5}, WANG Lilong¹

(1. Stem Cell and Tissue Engineering Research Center, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. Clinical Medicine College, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of

Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 5. The Centre of

Animal Laboratory, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify human amnion mesenchymal stem cells (hAMSCs) from human placenta tissue. **Methods:** The cesarean full-term fetal placenta was collected, and human amnion mesenchymal stem cells were isolated with tissue adherent method and subcultured. The morphology of P1~P3 generation cells was observed, flow cytometry was employed to detect positive molecular CD73-APC, CD90-FITC, CD44-PE, CD105-Cy5.5 and negative molecular CD11b-PE, CD19-PE, CD34-PE, CD45-PE, HLA-DR-PE on the surface of the cell membrane, and cell proliferation was determined by six pore plate method. **Results:** hAMSCs exhibited fibroblastic morphology. When cultured for 3~6 days, hAMSCs came into logarithmic growth phase. hAMSCs expressed CD73, CD90, CD44 and CD105, didn't express CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR. **Conclusions:** hAMSCs are separated and cultured *in vitro*.

[Key words] stem cells; cell culture; placenta; amnion mesenchymal stem cells; isolation and identification

胎盘是由胚胎的胚膜和母体子宫内膜联合长成的母子间交换物质的过渡性器官,除含有

滋养细胞外,还含有大量血管及间充质成分;胎盘间充质干细胞是近年来新发现的从胎盘获取

^{*}[基金项目]国家自然科学基金[项目编号 30560159];贵州省"125计划"重大科技专项(黔教合重大专项字[2013]020)

^{**}通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn

网络出版时间:2014-02-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140226.1235.005.html>

的一类干细胞,与从脐带血或骨髓中提取的干细胞相比较,不但干细胞数量多而且可分化成多种类的组织细胞^[1-2]。而且胎盘组织来源于产后,其收取过程对母体和新生儿不造成任何损伤,不受伦理学和临床医学的限制。此外,研究人员从细胞表面抗原分析发现,胎盘间充质干细胞是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间的干细胞,由于其低免疫原性,不易被受体的免疫系统排斥,是理想的干细胞保存和利用的资源^[2-3]。胎盘的构造主要有3层:羊膜、绒毛膜和蜕膜,绒毛膜和蜕膜则富含血管和红细胞,不易分离;羊膜是一层易于分离,且结构简单的组织。如能从羊膜上分离出间充质干细胞,将是间充质干细胞的一个良好供体,为研究者提供一个获得间充质干细胞的简便途径。本研究旨在探讨用组织块贴壁法分离人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs),并对细胞进行培养和鉴定,探讨从胎盘羊膜分离获得间充质干细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源

胎盘取自健康足月新生儿剖宫产手术后,经家属知情同意并签署《胎盘处理协议书》后捐献所得。

1.2 主要材料与仪器

1.2.1 主要材料 透气式细胞培养瓶(NEST)、无菌刻度吸管、六孔板、离心管(NEST)、巴士德吸管、眼科剪、眼科镊、手术剪、青霉素小瓶、无菌培养皿、无菌方盘、细胞计数板等。

1.2.2 主要试剂 细胞培养液为L-DMEM(Gibco)加10% FBS(Hyclone)、0.25%胰蛋白酶(Hyclone)、5.5% NaHCO₃、青-链霉素混合液(Gibco)、台盼蓝染液、PBS、DMSO、Human MSC Analysis Kit(BD 562245)等。

1.2.3 主要仪器设备 超净工作台(苏州净化)、CO₂细胞培养箱(Thermo)、流式细胞仪(Backman MoFlo XDP)、倒置显微镜(Nikon TE-2000)、低温冷冻离心机(eppendorf 5810)、正置显微镜(Leica)等。

1.3 方法

1.3.1 hAMSCs 分离培养 无菌条件下将靠近脐带处的胎盘剪下,小心剥离羊膜,并用无菌生理盐水(NS)清洗数次直至液体清亮,将其转移至青霉素小瓶中用眼科剪剪成约1~2 cm大小,用眼科镊夹取并平铺于25 cm²细胞培养瓶中,沿培养瓶壁小心加入培养液,使培养液既能覆盖羊膜组织块,又不至于使其漂浮起来;最后将培养瓶置于37℃ 5% CO₂培养箱中培养。

1.3.2 hAMSCs 传代培养 当见组织块周围有细胞生长后,每2 d换液1次,当细胞呈片状生长时,可用无菌PBS洗去羊膜组织块;此后,隔日换液1次,细胞长成单层时即可传代;传代时用无菌PBS液先洗2遍后,以去除残留的培养液,然后用0.25%胰蛋白酶溶液(约1.5 mL)于37℃消化约3 min,培养液中中止消化,用巴士德吸管小心吹打细胞使其从培养瓶上脱落,转移至15 mL离心管中,800 r/min离心3 min,弃上清,沉淀用培养液重悬,平均分配至2个培养瓶中,置于37℃ 5% CO₂培养箱中培养,次日换液。

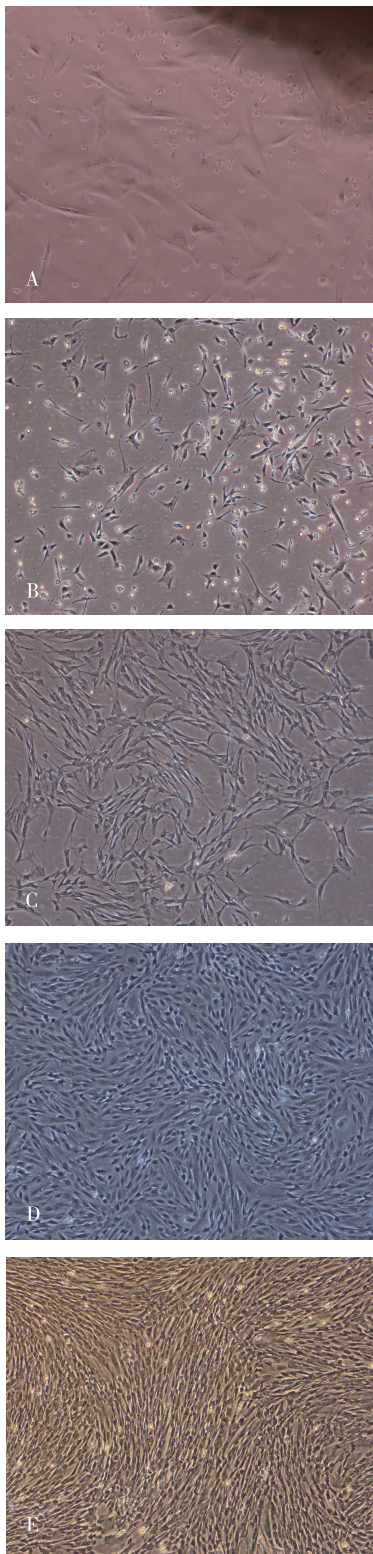
1.3.3 hAMSCs 表型鉴定 将分离传代至P3代的细胞,按照流式检测试剂盒(Human MSC Analysis Kit(BD 562245))使用说明和步骤操作,用流式细胞仪检测细胞膜表面分子,检测的阳性分子包括CD73-APC、CD90-FITC、CD44-PE、CD105-Cy5.5和阴性分子包括CD11b-PE、CD19-PE、CD34-PE、CD45-PE、HLA-DR-PE。

1.3.4 hAMSCs 增殖实验 采用六孔板法检测细胞增殖情况:将P3代的细胞接种于六孔板中,每孔细胞数量 1×10^5 ,置于37℃ 5% CO₂培养箱中培养,隔日换液1次,待细胞长成单层后每日取1孔细胞进行台盼蓝染色,用细胞计数板计数活细胞数,并绘制增殖曲线。

2 结果

2.1 细胞形态

原代羊膜组织块贴壁7~10 d左右可见细胞从组织块周围长出(见图1A),换液后细胞生长良好,外形类似成纤维细胞,呈片状生长,细胞形态多样,以梭形为主,可见多角形、星形等(见图1B),传代后细胞增殖迅速,逐渐呈流水状生长(见图1C、图1D、图1E)。

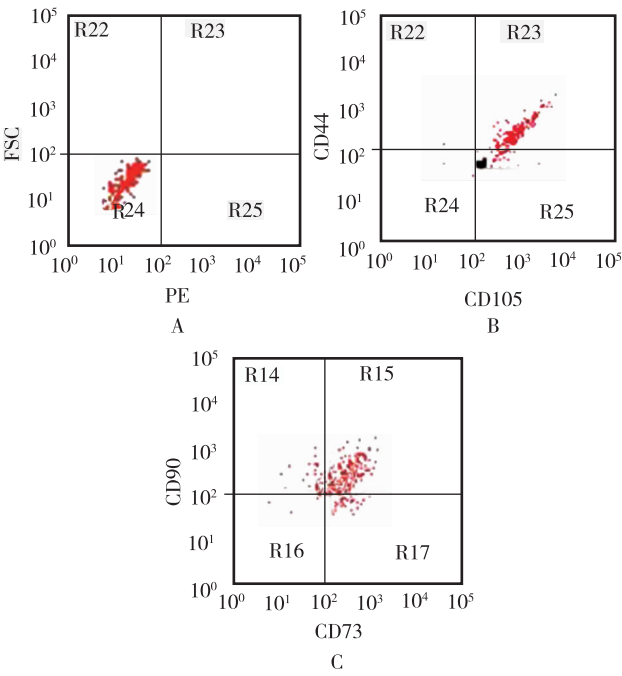


注:A:原代培养第 7 天; B:原代培养第 12 天; C: P1 代 hAMSCs; D:P2 代 hAMSCs; E:P3 代 hAMSCs

图 1 P0-P3 代 hAMSCs 的细胞形态 (40 ×)
Fig. 1 The morphology of hAMSCs of P0-P3 generation

2.2 免疫表型

收集 P3 代的细胞,经流式细胞术检测,发现细胞膜表面不表达 CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA – DR 分子;但高表达 CD44、CD105、CD73 和 CD90,阳性分子的表达量 90 % 以上(图 2)。



注:A: CD11b-PE、CD19-PE、CD34-PE、CD45-PE、HLA-DR-PE 结果; B: CD44-PE and CD105-Cy5.5 结果; C: CD73-APC and CD90-FITC 结果

图 2 羊膜间充质干细胞免疫表型 (P3)
Fig. 2 The immunophenotype of hAMSCs

2.3 细胞增殖实验

P3 代细胞呈一个典型的“S”型增长曲线, 1 ~ 2 d 处于缓慢的贴壁生长期, 3 ~ 6 d 处于对数生长期, 7 ~ 8 d 后处于平台期, 细胞增殖变慢 (图 3)。

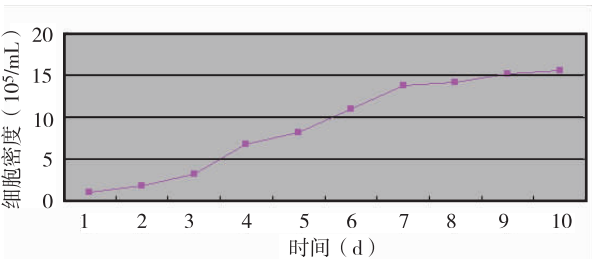


图 3 hAMSCs 细胞增殖曲线 (P3)
Fig. 3 The cell proliferation curves of hAMSCs

3 讨论

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 是干细胞家族的重要成员,来源于发育早期的中胚层和外胚层, MSC 最初在骨髓中被发现,因其具有多项分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。如间充质干细胞在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝脏、心肌、内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多项分化潜能,可作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。研究发现, MSC 不仅能够从骨髓中获得,某些组织也含有大量的 MSC,例如:脂肪、骨骼、肝脏、脐血等,尤其是围产期组织,因其具有免疫活性低、增殖能力强和来源无伦理学争议等优点,是骨髓 MSC 的理想替代物,倍受研究者的关注。

胎盘间充质干细胞是近年来新发现的从胎盘获取的一类干细胞,与脐带 MSC 和骨髓 MSC 有很多相同之处:相似的细胞形态、生长周期和分化能力;主要表达的膜分子包括:整合蛋白家族 CD29、透明质酸盐受体 CD44、间质干细胞标志 CD105、CD73、CD90、CD166,不表达的标志有:CD 19、造血细胞标志 CD34、CD45、人白细胞抗原 HLA-DR 等。研究发现胎盘 MSC 是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间的新种干细胞,它不易被受体的免疫系统排斥^[2-7]。

胎盘的构造主要有羊膜、绒毛膜和蜕膜 3 层,羊膜易于从胎盘上剥离,而绒毛膜和蜕膜因富含血管,并且交错生长,不易分离^[8-11]。因此,目前分离胎盘 MSC 的主要研究方法是将这 3 层组织一同用消化酶消化。基于此,本实验采用组织块贴壁法分离 hAMSCs。

通过将羊膜组织块贴附在培养瓶上进行培养,7~10 d 后从组织块周围生长出细胞,形态多样,但以长梭形为主,传代后生长迅速,呈流水状生长,3~6 d 达生长高峰,这与骨髓 MSCs 的生长特性一致;传代至第 3 代,通过流式检测细胞膜表面分子,结果显示:细胞高表达 CD44、CD105、CD73 和 CD90,其表型特征与骨髓 MSCs 相似。说明本实验从胎盘羊膜组织中分离出细胞是 hAMSCs,为进一步研究 hAMSCs 的生物学和免疫学特性、分化能力、核型稳定性,以及将其作为临床应用的种子细

胞等提供了基础。

4 参考文献

- [1] Zhang Hong-yan, Yang Nai-long. Biological characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010 (1):7535-7538.
- [2] Kranz A, Wagner DC, Kamprad M, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats[J]. Brain Res, 2010(1315): 128-136.
- [3] Chang YJ, Hwang SM, Tseng CP, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane[J]. Cells Tissues Organs, 2010 (2):93-105.
- [4] Fotino C, Ricordi C, Lauriola V, et al. Bone marrow-derived stem cell transplantation for the treatment of insulin-dependent diabetes[J]. Rev Diabet Study, 2010 (2): 144-157.
- [5] Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Portmann R, et al. Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes[J]. Am J Obstet Gynecol. 2010 (3):294-294.
- [6] Castrechini NM, Murthi P, Gude NM, et al. Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche[J]. Placenta, 2010 (3):203-212.
- [7] Huang YC, Yang ZM, Jiang NG, et al. Characterization of MSCs from human placental decidua basalis in hypoxia and serum deprivation[J]. Cell Biol Int, 2010 (3):237-243.
- [8] Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation[J]. Am J Obstet Gynecol, 2010 (2):193-193.
- [9] 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 differentiation into endothelial cells in vitro[J]. BMC Dev Biol, 2007 (7): 11-25.
- [10] Kassen M, Abdallah BM. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases[J]. Cell Tissue Res, 2008 (1):157-163.
- [11] Int Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta[J]. Stem Cells, 2004 (7):1338-1345.

(下转第 17 页)

- [15] Nijmeijer BA, Suzhai K, Goselink HM, et al. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors [J]. *Exp Hematol*, 2009(3):376–385.
- [16] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003(7):3983–3988.
- [17] Dunne Fong, Arthur Yeh, Rotem Naftalovich, et al. Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: Towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals [J]. *Cancer Let*, 2010(1): 65–72.

(2014-01-25收稿)

中文编辑:文箫颖;英文编辑:周 凌

(上接第7页)

- [5] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction [J]. *Nat Med*, 2006(4):459–465.
- [6] 许键伟,舒莉萍,申长清,等. 骨髓间充质干细胞上清液对大鼠佐剂性关节炎防治作用的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2013(14): 5–10.
- [7] Chen D, Ma F, Xu S, et al. Expression and role of Toll-like receptors on human umbilical cord mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2013(4):423–433.
- [8] 陶然,韩焱福,柴家科. 人脐带组织间充质干细胞研究进展及应用前景[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010(3):293–295.
- [9] Le BK, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study [J]. *Lancet*, 2008(9624): 1579–1586.
- [10] Zhang J, Chen GH, Wang YW, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction[J]. *Chin Med J*, 2012(19):3472–3478.
- [11] Wu YM, Cao YB, Li XH, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: Successful engraftment and mild GVHD [J]. *Stem Cell Research*, 2013(12):132–133.
- [12] Zhou CH, Yang B, Tian Y, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes[J]. *Cell Immunol*, 2011(1):33–38.

(2014-01-21收稿)

中文编辑:文箫颖;英文编辑:周 凌

(上接第11页)

- [12] Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration [J]. *AM J Obstet Gynecol*, 2006(3):664–673.
- [13] 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(6):1173–1183.

(2014-01-19收稿)

中文编辑:文箫颖;英文编辑:周 凌

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 \bar{x} , 卡方的符号是希腊字母 χ^2 , 自由度的符号是希腊文“ ν ”, 不是拉丁文“ V ”。样本的相关系数是英文“ r ”, 不能误为希腊文“ γ ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+ , Ca^{2+} , P^{3-} 等等, 不采用 Ca^{++} , P^{---} , Al^{+3} , O^{-2} 表示; 核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如: ^{131}I , ^{32}P ; 表示激发状态的 m 写在右上角, 例如: $^{99}\text{Tc}^m$, $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称, 即不能写成 $^{131}\text{碘}$ 、 $^{133}\text{m}\text{铟}$ 、 P^{32} 、 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确形式, 要对符号的来源及其内涵有深刻的了解, 才能在使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA) 3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。

《贵阳医学院学报》编辑部