

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.49.019

[http://www.crter.org]

毕薇薇, 何丽嵘, 李超, 聂德志. 人羊膜间充质干细胞体外大量扩增的方法[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(49):8583-8589.

人羊膜间充质干细胞体外大量扩增的方法☆

毕薇薇^{1,2}, 何丽嵘², 李超², 聂德志² (¹四平市中心医院, 吉林省四平市 136000; ²吉林省拓华生物科技有限公司, 吉林省四平市 136000)

文章亮点:

1 文章旨在建立一种简便的、低成本的、适合大量扩增并且稳定的羊膜间充质干细胞的培养方法, 以便为其研究和应用提供足量的并符合质量要求的细胞。

2 实验的特点在于采用胰酶一步消化后, 去除羊膜上皮细胞, 并用细胞刮刀将残留的羊膜上皮细胞刮除, 以保证间充质干细胞的纯度。传至第5代流式细胞鉴定细胞表面标志结果为 CD90、CD73、CD105 三阳大于 95%, CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR 五阴小于 2%, 符合国际细胞治疗协会(ISCT)制定的间充质干细胞标准。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 人羊膜间充质干细胞; 羊膜; 间充质干细胞; 成骨诱导; 成脂诱导; 茜素红染色; 油红 O 染色; 细胞培养; 生物学特性; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 成骨细胞; 羊膜

摘要

背景: 一个胎盘羊膜的面积约 600 cm², 羊膜来源间充质干细胞即取材于胎盘上的羊膜。

目的: 建立一种简单的体外分离培养人羊膜来源间充质干细胞的方法, 并分析其生物学特性。

方法: 采用胰酶和直接贴壁相结合的方法分离获取人羊膜来源间充质干细胞并进行体外培养, 观察细胞形态, 分析传代第5代细胞生长曲线, 检测第5代细胞表面标志表达和检测细胞周期。取传代第4代细胞行体外成骨细胞诱导和成脂诱导, 冻存第4代细胞6个月后复苏, 计数复苏后细胞存活率并绘制复苏细胞生长曲线。

结果与结论: 原代接种后第9天有少许细胞爬出, 15 d左右细胞达 80%-90%融合, 细胞以梭形为主。细胞传代后, 细胞形态均一, 螺旋状排列。传代细胞潜伏期 48 h, 对数增殖期 4 d左右, 对数增殖期后进入平台期。间充质干细胞表面 CD34、CD14、CD19、CD45、HLA-DR 呈阴性表达, CD73、CD105、CD90 呈阳性表达。茜素红染色及油红 O 染色阳性, 证实具有向脂肪细胞、成骨细胞分化的能力。流式细胞术细胞周期检测, S 期占 28%。冻存复苏后细胞存活率达 90% 以上, 且与未冻存传代细胞具有相同的生长特性。结果证实实验成功地建立了一种简化的人羊膜来源间充质干细胞大量扩增的方法。

Proliferating a large amount of human amnion mesenchymal stem cells *in vitro*

Bi Wei-wei^{1,2}, He Li-rong², Li Chao², Nie De-zhi² (¹Central Laboratory of Siping Center Hospital, Siping 136000, Jilin Province, China; ²Jilin Tuohua Biotechnology Co., Ltd., Siping 136000, Jilin Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Amnion mesenchymal-derived stem cells are obtained from the placenta with a placenta amniotic membrane of about 600 cm².

OBJECTIVE: To establish a kind of simple isolation and culture method of mesenchymal stem cells derived from human amnion *in vitro*, and to explore their biological properties.

METHODS: Mesenchymal stem cells derived from human amnion were harvested by trypsin digestion combined with direct adherence. The morphology of human amnion-derived mesenchymal stem cells was observed. The passage 5 cells were collected to draw a cell growth curve. Surface markers and cell cycle of the passage 5 cells were determined using flow cytometry. Passage 4 cells were obtained for osteogenic and adipogenic induction. After 4 months of cryopreservation, the resuscitated passage 4 cells were counted to determine cell survival rate and draw the cell growth curve.

RESULTS AND CONCLUSION: A few of cells crept at day after primary seeding. About after 15 days, 80%-90% cells fused in a spindle shape. After passage, the cells showed even morphology and arranged spirally. The latency period of the passaged cells was 48 hours and logarithmic growth phase was about 4 days. After logarithmic growth phase, the cells entered the platform period. The flow cytometry results showed negative expression of CD34, CD14, HLA-DR, CD19, CD45, but positive expression of CD73, CD105, CD90 on the

毕薇薇☆, 女 1974 年生, 吉林省四平市人, 汉族, 博士, 主任技师, 主要从事干细胞的基础研究与临床应用研究。
biweiwei1974@163.com

通讯作者: 聂德志, 博士, 吉林省拓华生物科技有限公司, 吉林省四平市 136000
ndz2002@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)49-08583-07

修回日期: 2013-09-15
(201304155/W · W)

Bi Wei-wei☆, M.D., Chief technician, Central Laboratory of Siping Center Hospital, Siping 136000, Jilin Province, China
biweiwei1974@163.com

Corresponding author: Nie De-zhi, M.D., Jilin Tuohua Biotechnology Co., Ltd., Siping 136000, Jilin Province, China
ndz2002@126.com

Accepted: 2013-09-15

surface of mesenchymal stem cells. The alizarin red and oil red O staining was positive and confirmed osteogenic and adipogenic capacity of human amnion-derived mesenchymal stem cells. Flow cytometry results showed that 28% cells were in S phase. After cryopreservation, the survival rate of resuscitated cells was up to 90%, and the resuscitated cells had the same growth characteristic with the non-cryopreserved cells. These results confirm a simple method to proliferate a great amount of human amnion-derived mesenchymal stem cells.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; osteoblasts; amnion

Bi WW, He LR, Li C, Nie DZ. Proliferating a large amount of human amnion mesenchymal stem cells in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(49):8583-8589.

0 引言 Introduction

由于干细胞的多项分化潜能及其分泌多种细胞因子的功能, 备受研究者的青睐。近年来, 干细胞在组织损伤与修复中的应用越来越广泛^[1], 而干细胞的来源一直是人们关注的焦点。骨髓间充质干细胞是较早被认识的成体干细胞之一。但由于抽取骨髓给患者带来痛苦, 而且骨髓干细胞的含量极少, 使大量获得受到限制。其他来源如脂肪组织, 皮肤组织等都需取材于人体自体或异体组织, 也不易取材或可能涉及伦理问题。

人羊膜来源于人胎盘组织, 无血管、神经及淋巴, 具有一定的弹性, 厚0.02–0.5 mm, 在电镜下, 其分为5层: 上皮层、基底膜、致密层、纤维母细胞层和海绵层。羊膜属于孕妇生产后的废弃物, 一个胎盘的羊膜面积大约有600 cm², 而且羊膜易于从胎盘上剥离, 所以因羊膜具有取材方便, 原料充足的特点而被认为是目前间充质干细胞的最佳来源^[2]。

人羊膜为半透明的薄膜, 有多种促进细胞增殖的营养成分。羊膜基底膜和羊膜基质层含有大量不同的胶原, 主要为 I、III、IV、V、VII型胶原和纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等成分。新鲜羊膜能产生一些生长因子如: 碱性成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子和转化生长因子 β 等。目前, 正在研究利用羊膜干细胞治疗多种疾病, 包括神经系统疾病、心肌梗死、肌萎缩症、糖尿病及肝纤维化等^[3-7]。Kim等^[8]研究表明羊膜间充质干细胞通过有高的血管生成能力和移植成活力, 能促进糖尿病大鼠伤口的愈合。Li等^[9]报道利用羊膜间充质干细胞和羊膜上皮细胞能构建双层的组织工程皮肤。实验从羊膜中提取间充质干细胞, 旨在建立一种简便、稳定的适合人羊膜间充质干细胞生长和扩增的培养方法, 研究其生物学特性, 为其进一步研究和应用奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体外细胞学观察实验。

时间及地点: 于2012年6至11月在四平市中心医院

中心实验室完成。

材料: 健康孕妇剖宫产胎儿羊膜, 供者肝炎病毒标志物、梅毒、HIV检测均阴性。供者对实验知情同意, 经医院伦理委员会批准。

人羊膜间充质干细胞的分离培养及生物学特性实验主要仪器与试剂:

试剂及仪器	来源
α -MEM 培养基、特级胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	GIBCO 公司
细胞周期检测试剂盒	美国 BD 公司
荧光抗体 CD34、CD45、CD14、cd19、HLA-DR、CD90、CD73、CD105 及相应同型对照	美国 ebioscience
1.5 mL 细胞冻存管、细胞培养瓶、离心管、细胞刮刀	美国 Corning
二氧化碳培养箱	美国 Thermo 371 型
倒置显微镜	日本 Olympus CKX41
流式细胞仪	美国 BD FASCCalibur
离心机	美国 Thermo Multifuge 4KR
生物安全柜	北京东联哈尔仪器公司
程序降温盒	美国 Nalgene
-80 °C 低温冰箱	日本 SANYO 382L

实验方法:

人羊膜间充质干细胞的分离、培养: 无菌条件下从胎盘剥离羊膜, 用PBS洗涤数次, 去除羊膜上的血丝及黏稠物。在培养皿中将羊膜剪成6 cm×6 cm的小块, 2.5 g/L加入胰蛋白酶消化30 min, 用含体积分数10% 胎牛血清的 α -MEM培养液中和, 洗涤去掉消化下来的上皮细胞, 再用细胞刮刀进一步将羊膜片残留的上皮细胞刮净。后将羊膜片剪碎, 用PBS洗涤3次, 每次均1 500 r/min离心5 min。离心后的沉淀用少量含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM 培养液悬浮后直接接种于细胞培养皿中, 置于37 °C、体积分数5% CO₂培养箱中培养。24 h后添加培养基。以后每隔3 d加1次培养液, 全过程定时观察细胞生长情况并照相。培养15 d左右细胞达80%以上融合后, 进行传代培养记为P1。4 d左右再传代, 依次记为P1–P10 代。

人羊膜间充质干细胞生长曲线的测定: 选择P5代细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化并中和后, 用含体积分数10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液悬浮, 按 $5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于24孔板中, 每孔1 mL细胞悬液。每天取3个孔

的细胞消化计数,连续取8 d,每批3个孔的细胞数计算平均值。以时间为横轴,细胞数量为纵轴,制作间充质干细胞生长曲线。

人羊膜间充质干细胞表面标志物检测:选择P5代细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶消化并中和。用PBS洗涤3次,制备成细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的悬液,分别装入流式专用检测试管中,每管0.1 mL。分别加入FITC标记的小鼠抗人CD14、CD34、CD19、CD45、HLA-DR、CD44、CD90、CD73、PE标记的CD105单抗,并分别以相应荧光标记的IgG做同型对照,避光放置15 min后,用流式细胞仪检测。

人羊膜间充质干细胞成骨分化实验:选择P4代细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶消化并中和,用含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养液悬浮。在6孔板内放入预先包被多聚赖氨酸的盖玻片,以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于盖玻片上。细胞在盖玻片上生长达80%以上时,更换成骨诱导培养基,为包含 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的 β -甘油磷酸钠、 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 的地塞米松、 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 维生素C的 α -MEM培养基,同时选择1孔继续加入原 α -MEM培养液作为阴性对照,每3 d更换1次诱导液及对照空培养基。每日观察细胞生长状态,诱导2周左右,观察细胞,取出盖玻片,茜素红染色鉴定。

人羊膜间充质干细胞成脂分化实验:选择P4代细胞,用2.5 g/L胰蛋白酶消化并中和后,用含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养液悬浮。在6孔板内放入预先包被多聚赖氨酸的盖玻片,以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于盖玻片上。细胞在盖玻片上生长达80%以上时,更换为成脂诱导培养基(α -MEM培养基中包含0.5 mmol/L IBMX、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、100 mg/L吡哆美辛、10 mg/L胰岛素及体积分数10%胎牛血清),3 d后更换为成脂诱导维持液(含10 mg/L胰岛素、体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养基),24 h后再换成脂诱导液共约培养18 d,进行油红O染色鉴定。同时以仅加入 α -MEM培养液作为阴性对照。

细胞增殖周期测定:取生长良好的P5代细胞,用2.5 g/L胰酶(含1 mmol EDTA)消化并中和。用PBS洗涤2次,制备成浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液。300 g离心去上清,加入细胞周期检测试剂盒中的A液250 μL ,轻轻混匀,不要振荡,室温静置10 min,再加入B液200 μL ,轻轻混匀,不要振荡,室温静置10 min,最后加入C液200 μL 轻轻混匀,不要振荡,低温4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置10 min后上流式细胞仪检测。

羊膜间充质干细胞的冻存与复苏:预先配置细胞冻存液(α -MEM培养基:血清:二甲基亚砷=6:3:1)放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。选取生长良好的P4代细胞,用2.5 g/L胰酶(含1 mmol EDTA)消化并中和。取0.1 mL细胞悬液于EP管中,计数细胞数量并计算出冻存细胞浓度及细胞活率。细胞悬液离心后,细胞沉淀用预冷的冻存液

悬浮混匀,分装入细胞冻存管中,放至4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的程序降温盒中,在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻24 h后转入液氮长期保存。6个月后取出冻存管,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,1 min内快速使细胞融化。用PBS洗涤细胞2次。用锥虫蓝染色计数细胞数量及检测细胞活率。复苏后的细胞用含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养基于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO₂培养箱中培养,每日倒置相差显微镜下观察细胞生长状态。并制作复苏细胞的生长曲线,方法同前。

主要观察指标:①倒置显微镜下观察原代培养及传代培养细胞形态。②细胞生长曲线分析。③细胞成骨诱导、成骨诱导结果。④细胞表面标志检测结果。⑤流式细胞术检测细胞周期结果。⑥细胞冻存及复苏生长特性分析。

统计学分析:共进行4次羊膜间充质干细胞的提取($n=4$),统计数据用SPSS 12.0软件处理,人羊膜间充质干细胞冻存前后比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 视为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 倒置显微镜下观察细胞形态 原代接种第9天左右可见少量细胞爬出,细胞形态不均一,呈多角形、短梭形或纤维形,散在。见图1。此后细胞继续爬出并扩增,原代培养15 d左右细胞达80%~90%融合,此时细胞以梭形为主。细胞传代后,细胞形态均一,有螺旋状排列趋势,较紧密,见图2。



注:细胞爬出成多形性,形态不均一,呈多角形、短梭形或纤维形,散在。

图1 原代人羊膜间充质干细胞培养第9天细胞形态(倒置显微镜, $\times 4$)

Figure 1 Morphology of primary human amnion mesenchymal stem cells at 9 d of culture (Inverted microscope, $\times 4$)

2.2 人羊膜间充质干细胞生长曲线分析 传代的细胞生长较原代要快,一般四五天能达到90%以上融合。通过对第5代细胞的生长曲线观察,发现人羊膜间充质干细胞传代培养的潜伏期为48 h,对数增殖期为4 d左右,对数增殖期后进入平台期,见图3。



注: 细胞形态均一, 有螺旋状排列趋势, 较紧密。

图2 第4代人羊膜间充质干细胞培养第3天细胞形态(倒置显微镜, $\times 4$)

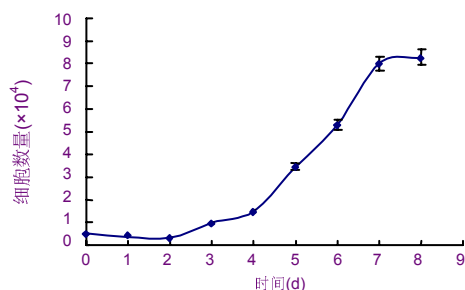
Figure 2 Morphology of passage 4 human amnion mesenchymal stem cells at 3 d of culture (Inverted microscope, $\times 4$)



注: 阴性对照未见细胞染色。

图5 人羊膜间充质干细胞成骨诱导阴性对照结果($\times 4$)

Figure 5 Negative control results of human amnion mesenchymal stem cells after osteogenic induction ($\times 4$)

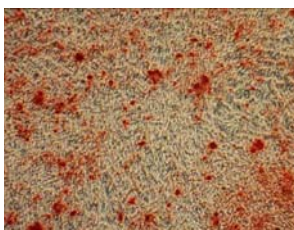


注: 人羊膜间充质干细胞传代培养的潜伏期为 48 h, 对数增殖期为 4 d 左右, 对数增殖期后进入平台期。

图3 第5代羊膜间充质干细胞生长曲线

Figure 3 Growth curves of passage 5 human amnion mesenchymal stem cells

2.3 人羊膜间充质干细胞成骨诱导结果 成骨诱导2周后, 茜素红染色, 细胞局部堆集成灶状, 形成橘红色钙结节, 见图4。阴性对照未见细胞染色, 见图5。证实羊膜来源的间充质干细胞有成骨的潜能。

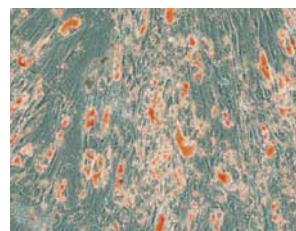


注: 细胞茜素红染色阳性, 局部堆集成灶状, 形成橘红色钙结节。

图4 人羊膜间充质干细胞成骨诱导2周后茜素红染色($\times 4$)

Figure 4 Alizarin red staining of human amnion mesenchymal stem cells at 2 wk of osteogenic induction ($\times 4$)

2.4 人羊膜间充质干细胞成脂诱导结果 成脂诱导后, 胞质内形成透亮的小液滴, 被油红O染成橘红色, 见图6; 阴性对照未见细胞染色, 见图7。



注: 成脂诱导后, 油红O染色阳性, 胞质内形成透亮的小液滴, 被油红O染成橘红色。

图6 人羊膜间充质干细胞成脂诱导油红O染色($\times 20$)

Figure 6 Oil red O staining of human amnion mesenchymal stem cells after adipogenic induction ($\times 20$)



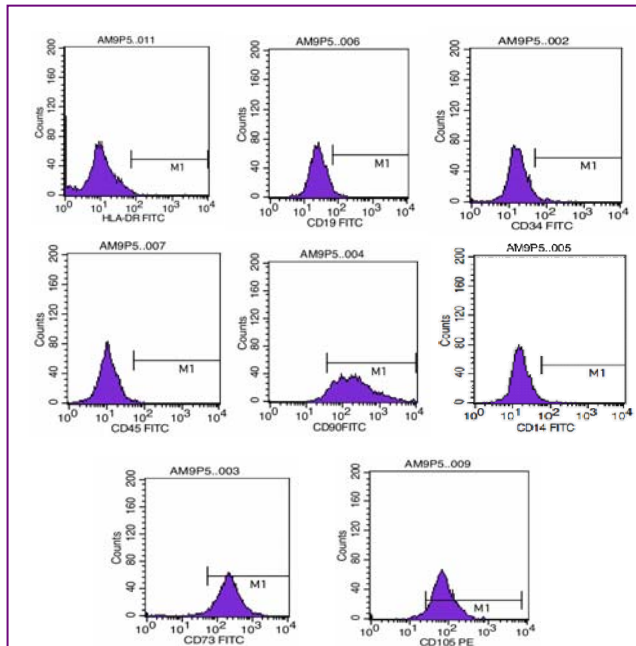
注: 阴性对照未见细胞染色。

图7 人羊膜间充质干细胞成脂诱导阴性对照结果($\times 20$)

Figure 7 Negative control results of human amnion mesenchymal stem cells after adipogenic induction ($\times 20$)

2.5 人羊膜间充质干细胞表面标志检测结果 流式细胞术检测结果CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR

均阴性表达,小于2%。CD90、CD73、CD105均阳性表达,大于95%。见图8。

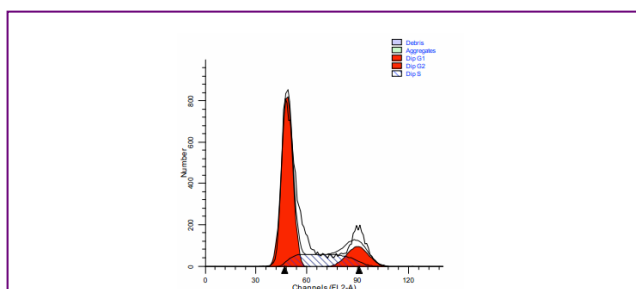


注:流式细胞术检测结果 CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR 均阴性表达,小于2%。CD90、CD73、CD105 均阳性表达,大于95%。

图8 人羊膜间充质干细胞表面标志检测结果

Figure 8 Surface marker test results of human amnion mesenchymal stem cells

2.6 流式细胞术检测细胞周期结果 第4代细胞传代后48 h, S占整个细胞周期的28%,说明此阶段细胞增殖旺盛。见图9。



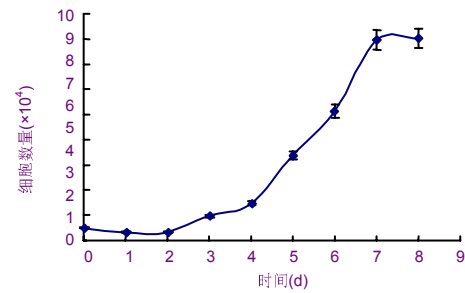
注: S 期占28%。

图9 第4代人羊膜间充质干细胞周期检测结果

Figure 9 Cell cycle detection of passage 4 human amnion mesenchymal stem cells

2.7 细胞冻存及复苏生长特性分析 锥虫蓝计数复苏后细胞存活率90%以上,种于培养瓶中继续培养结果细胞增殖能力强,传代时间为4 d左右,与未冻存过的传代细胞生长曲线差异无显著性意义(冻存前后 $P > 0.05$)。

见图10。



注:与未冻存过的传代细胞生长曲线差异无显著性意义。

图10 第4代人羊膜间充质干细胞冻存复苏后生长曲线

Figure 10 Growth curve of resuscitated passage 4 cells after cryopreservation

3 讨论 Discussion

人羊膜产生于受精后8 d的外胚层,先于囊胚。所以从羊膜分离出的细胞,可能保持原肠期胚胎初期干细胞的可塑性^[10]。人羊膜由上皮和间充质细胞组成,羊膜间充质干细胞属成体干细胞,具有自我更新,低免疫原性等特点。羊膜为孕妇生产后的废弃物,患者自愿捐献不存在伦理问题,原料来源充足。

国内外学者已研究出通过化学诱导或基因转染技术可使羊膜间充质干细胞不仅能向来源于中胚层的骨、软骨、肌细胞、成血管、及脂肪分化^[11-16],还可向神经细胞、上皮细胞、心肌细胞、肝样细胞、胰腺细胞等多系分化^[17-23]。羊膜间充质干细胞在诱导后,表达主要的软骨成分,在体内移植如小鼠腹肌内,有II型胶原的沉积^[24-25]。

羊膜间充质干细胞易于外源基因的表达,而且间充质干细胞所携带的外源基因表达具有明显的组织特异性。转导入外源基因的仍能向成骨、成脂、成软骨分化且维持转基因表达。羊膜的研究及应用越来越引起人们的关注,Teng等^[26]已成功研究出将羊膜间充质干细胞转入端粒酶逆转录酶基因,使HAM细胞获得永生。

间充质干细胞有多种来源,但可分为两类:骨髓来源和各种组织来源。骨髓来源多选用密度梯度离心法和磁珠分选法。而各种组织来源的间充质干细胞文献报道对采用双酶消化或多种酶联合消化法,如胰酶、胶原酶、Dispase酶、DNA酶。国内外已有学者用胰酶和胶原酶先后消化羊膜提取间充质干细胞^[27-29],实验操作步骤多、时间较长。Soncini等^[30]的方法为将羊膜剪成2 cm×2 cm的小块,用dispase酶先消化7 min,再在RPMI1640中浸泡10 min,再用胶原酶和DNA酶共同于37℃下消

化3 h, 然后过滤离心后接种于培养瓶中。虽然细胞产量较好, 但步骤较多、操作时间长、试剂成本高, 还需掌握好消化时间和消化状态, 不易掌握。另有研究者根据羊膜间充质干细胞的表面标志用流式细胞分选的方法分离HAM细胞, 但设备昂贵, 操作技术要求较高, 不适于大量分离。

本实验采用胰酶一步消化后, 去除羊膜上皮细胞, 并用细胞刮刀将残留的羊膜上皮细胞刮除, 以保证间充质干细胞的纯度。然后将羊膜基质剪碎直接贴壁使细胞爬出, 简化操作步骤, 节省了试剂成本, 并能在体外稳定地获得较多的具有很强增殖能力的间充质干细胞。传至第5代流式细胞术鉴定细胞表面标志结果为CD90、CD73、CD105三阳(大于95%), CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR五阴(小于2%), 符合国际细胞治疗协会(ISCT)制定的间充质干细胞标准。Silvia还检测了CD29为73.95%, CD166为52.11%^[31], 为进一步研究羊膜间充质干细胞的鉴定、纯化奠定了基础。

Kang等^[32-33]研究羊膜来源间充质干细胞不仅在组织修复中具有重要应用价值, 还具有抗肿瘤作用及免疫调节作用。另外, 人羊膜间充质干细胞除表达间充质干细胞表面标志, 还表达胚胎干细胞类的表面标志物Oct-3/4、SSEA-3、SSEA-4、Rex-1和BMP-4^[34-35]。羊膜干细胞被认为是介于胚胎干细胞和成体干细胞中间阶段的细胞, 因而更具幼稚型, 增殖能力强但无致瘤性。人羊膜间充质干细胞能分泌比骨髓源间充质干细胞更丰富的多种细胞因子, 被用来作为饲养层细胞来培养胚胎干细胞^[36]。

由于羊膜间充质干细胞增殖能力强并具有多项分化特性, 旁分泌特性等, 使其在再生医学的基础研究和临床应用中极具潜力, 因而, 羊膜间充质干细胞大规模的分离培养是研究和应用的基础。文章旨在建立一种简便的、低成本的、适合大量扩增并且稳定的羊膜间充质干细胞的培养方法, 以便为其研究和应用提供足够量的并符合质量要求的细胞。

作者贡献: 实验设计及评估者为第一作者和通讯作者, 实施为全部作者, 均受过专业培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 健康孕妇剖宫产胎儿羊膜供者对实验知情同意, 经医院伦理委员会批准。

学术术语: 饲养层细胞-指一些特定细胞如颗粒细胞、成纤维细胞、输卵管上皮细胞等已在体外培养的细胞, 经有丝分裂阻断剂, 如常用的丝裂霉素等处理后所得的细胞单层, 是细胞培养尤其是胚胎干细胞培养常用的生长增殖促进剂和分化抑制剂。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密,

无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007; 25(11):2896-2902.
- [2] Saito S, Lin YC, Murayama Y, et al. Human Amnion-derived Cells as a Reliable Source of Stem Cells. *Curr Mol Med*. 2012; 12(10):1340-1349.
- [3] Li F, Miao ZN, Xu YY, et al. Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of focal cerebral ischemia. *Mol Med Report*. 2012; 6(3):625-630.
- [4] Xue SR, Yang XX, Dong WL, et al. Monoamine alterations and rotational asymmetry in a rat model of Parkinson's disease following lateral ventricle transplantation of human amniotic epithelial cells. *Neural Regen Res*. 2009; 4(12): 1007-1012.
- [5] Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res*. 2010; 106:1613-1623.
- [6] Kawamichi Y, Cui C H, Toyoda M, et al. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol*. 2010; 223: 695-702.
- [7] Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res*. 2012; 349(2):447-458.
- [8] 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. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41105.
- [9] Li H, Chu Y, Zhang Z, et al. Construction of bilayered tissue-engineered skin with human amniotic mesenchymal cells and human amniotic epithelial cells. *Artif Organs*. 2012; 36(10):911-919.
- [10] Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, et al. Isolation of Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010; Chapter 1:Unit 1E.5.
- [11] Barba M, Pirozzi F, Saulnier N, et al. Lim Mineralization Protein 3 Induces the Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Fluid Stromal Cells through Kruppel-Like Factor-4 Downregulation and Further Bone-Specific Gene Expression. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:813894.
- [12] Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, et al. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1. *Brain Dev*. 2013; 35(4):349-355.
- [13] Warrier S, Haridas N, Bhonde R. Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue. *Placenta*. 2012; 33(10):850-858.
- [14] Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2012; 93(3): 525-534.

- [15] Wei JP,Nawata M,Wakitani S,et al.Human amnioticmesenchymal cells differentiate into chondrocytes. Cloning Stem Cells. 2009;11(1):19-26.
- [16] Warriar S,Haridas N,Bhonde R.Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue. Placenta. 2012;33(10):850-858.
- [17] ManochantrS,Tantrawatpan C, Kheolamai P, et al.Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells.J Med Assoc Thai. 2010;93 (7):S183-91.
- [18] Paracchini V, Carbone A, Colombo F,et al.Amniotic mesenchymal stem cells: a new source for hepatocyte-like cells and induction of CFTR expression by coculture with cystic fibrosis airway epithelial cells.J Biomed Biotechnol. 2012;2012:575471.
- [19] Kim HG, Choi OH.Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. Heart Vessels. 2011;26(2):196-205.
- [20] Tamagawa T,Ishiwata I,Sato K,et alInduced in vitrodifferentiation of pancreatic-like cells from human amnion-derivedfibroblast-like cells. Hum Cell.2009;22:55-63.
- [21] Díaz-PradoS,Muiños-LópezE,Hermida-GómezT,etal.Multiline age differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane.J Cell Biochem. 2010;111(4):846-857.
- [22] 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. Stem Cells Dev. 2012; 21(15): 2798-808.
- [23] Lu Y, Hui GZ, Wu ZY, et al. Transformation of human amniotic epithelial cells into neuron-like cells in the microenvironment of traumatic brain injury in vivo and in vitro. Neural Regen Res. 2011;6(10):744-749.
- [24] Wei J,P Nawata, M Wakitani, et al. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. Cloning Stem Cells. Cloning Stem Cells. 2009;11(1):19-26.
- [25] Nogami M, Tsuno H, Koike C,et al.Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. Transplantation. 2012; 93(12):1221-1228.
- [26] Teng Z, Yoshida T, Okabe M,et al. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplant. 2013;22(2):267-278.
- [27] Coli A, Nocchi F, Lamanna R, et al. Isolation and characterization of equine amnion mesenchymal stem cells. Cell Biol Int Rep (2010). 2011;18(1):e00011.
- [28] 朴正福,丁淑芹,张海燕,等.人羊膜间充质干细胞的分离及分化潜能的研究[J].生物医学工程与临床,2010,14,(1):15-19.
- [29] Miha CM,Rus Ciucă D,Soritău O,et al.Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(1):73-77.
- [30] Soncini M, Vertua E, Gibelli L,et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. J Tissue Eng Regen Med. 2007;1(4):296-305.
- [31] Silvia Dı´az-Prado, Emma Muinos-Lopez,Tamara Hermida-Go´me,et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane TISSUE ENGINEERING: Part C.2011;17 (1):49-59.
- [32] Kang NH, Hwang KA, Kim SU,et al.Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells.Cancer Gene Ther. 2012; 19(8):517-22.
- [33] Kang JW, Koo HC, Hwang SY,et al.Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells.J Vet Sci.2012;13(1):23-31.
- [34] Bilic G,Zeisberger SM,Mallik AS,et al.Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial andmesenchymal stromal cells for application in cell therapy. Cell Transplant.2008;17:955-968.
- [35] Sivasubramaniyan K, Lehnen D, Ghazanfari R,et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets. Ann N Y Acad Sci.2012;1266:94-106.
- [36] Zhang K, Cai Z, Li Y, et al. Utilization of human amniotic mesenchymal cells as feeder layers to sustain propagation of human embryonic stem cells in the undifferentiated state. Cell Reprogram. 2011;13(4):281-288.