

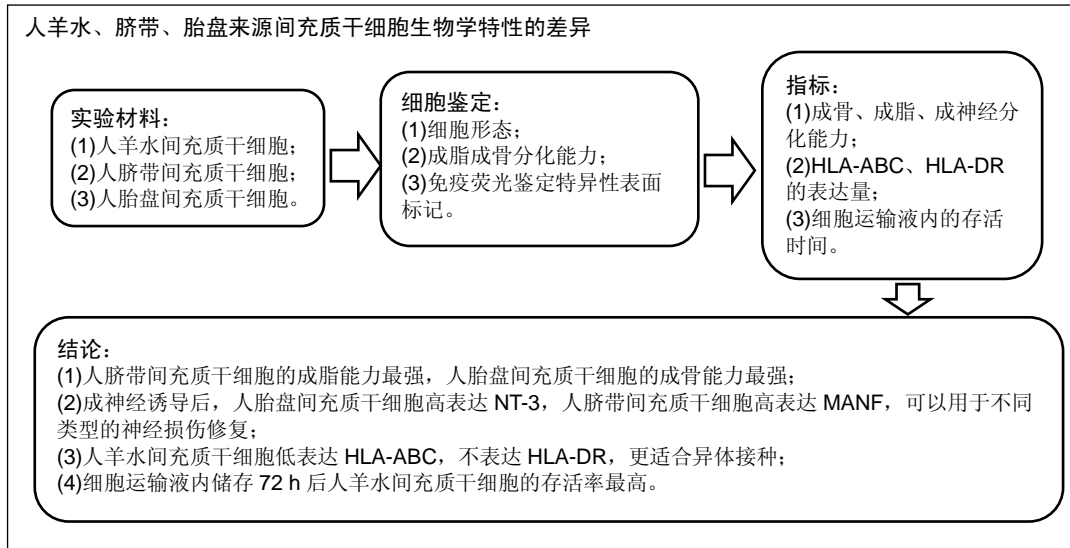
# 人羊水、脐带、胎盘来源间充质干细胞体外增殖、分化、运输和免疫学特性的比较

赵姝灿, 郑桂纯, 林连蓬, 梅展图, 王丙云, 陈胜锋, 陈志胜(佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东省佛山市 528200)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0960

ORCID: 0000-0002-4180-2611(陈志胜)

文章快速阅读:



赵姝灿, 女, 1995 年生, 广东省佛山市人, 汉族, 佛山科学技术学院在读硕士, 主要从事人间充质干细胞相关研究。

通讯作者: 陈志胜, 博士, 教授, 研究生导师, 佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东省佛山市 528200

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-06-27



文题释义:

组织相容性复合物 II 类分子: 是一种跨膜糖蛋白, 其主要生物学作用与抗原的加工递呈有关, 目前有研究表明其参与了多种肿瘤的发生及进展。

组织相容性复合物 I 类分子: 与 T 细胞介导的免疫反应密切相关。它具有高度的多态性, 在 T 细胞介导的免疫反应中, 起到了识别病原体的功能。

摘要

背景: 随着再生医学推进, 干细胞在疾病治疗中的使用频率逐步增高。目前在临床使用中, 细胞数量、分化能力、异体接种时产生免疫排斥的可能性等因素都需要考虑, 因此筛选出更适合临床使用的细胞种类显得十分有意义。

目的: 比较人羊水、脐带、胎盘来源间充质干细胞的体外增殖能力、分化能力、运输液中细胞活性、免疫学特性, 为临床应用提供选择依据。

方法: 分别对 3 种细胞进行分离培养和免疫荧光鉴定, 在体外诱导 3 种细胞成骨、成脂、成神经分化; qPCR 检测成神经分化后的 Nestin、NT-3、MANF 表达量; 流式细胞术定量分析 HLA-ABC、HLA-DR 的表达量; 将 3 种细胞放于细胞运输液内常温放置 24, 48, 72 h, 计算活细胞数量。

结果与结论: ①脐带间充质干细胞成脂能力最强, 胎盘间充质干细胞成骨能力最好, 3 种细胞均可以表达神经细胞标志 Nestin 和 GFAP; ②成神经诱导后的胎盘间充质干细胞高表达 NT-3, 脐带间充质干细胞高表达 MANF, 分别可以用于不同类型的神经损伤修复; ③羊水干细胞低表达 HLA-ABC, 不表达 HLA-DR, 更适合异体接种, 产生免疫排斥的可能最低; ④细胞运输液内储存 72 h 后羊水干细胞的存活率最高; ⑤由于羊水、胎盘、脐带间充质干细胞在生物学特性上稍有差异, 因此可根据其特点用于不同临床疾病治疗。

关键词:

人羊水间充质干细胞; 人胎盘来源间充质干细胞; 人脐带来源间充质干细胞; 生物学特性; 组织相容性抗体; 干细胞

主题词:

羊水; 胎盘; 脐带; 细胞增殖; 细胞分化; 组织工程

基金资助:

广东省教育厅预防兽医学重点实验室项目(2014KTSP037); 干细胞基础研究与应用开放平台(佛财工[2015]143 号); 佛山科学技术学院学生学术基金项目《一种便于运输的间充质干细胞储存液的发明》

缩略语:

人羊水干细胞: human amniotic fluid stem cells, hAFSCs; 人脐带间充质干细胞: human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs; 人胎盘间充质干细胞: human placenta mesenchymal stem cells, hP-MSCs

Zhao Shu-can, Master candidate, College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528200, Guangdong Province, China

Corresponding author: Chen Zhi-sheng, M.D., Professor, Master's supervisor, College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528200, Guangdong Province, China

## A comparative study on *in vitro* proliferation, differentiation, transportation and immunocompatibility of mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta

Zhao Shu-can, Zheng Gui-chun, Lin Lian-peng, Mei Zhan-tu, Wang Bing-yun, Chen Sheng-feng, Chen Zhi-sheng (College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528200, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** With the advancement of regenerative medicine, the use frequency of stem cells has gradually increased in the treatment of diseases. At present, several factors such as the number of cells, the ability of differentiation and the possibility of immunological rejection during allogeneic inoculation are taken into consideration in the clinical use of stem cells. Accordingly, it is very meaningful to screen out the more suitable type of stem cells for clinical use.

**OBJECTIVE:** To discuss the differences of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human amniotic fluid, umbilical cord and placenta in terms of the ability to proliferate *in vitro*, the ability to differentiate, the possibility of transport and the possibility of allogeneic inoculation, thereby providing evidence for the clinical application of MSCs.

**METHODS:** Three kinds of MSCs were isolated and cultured at first, and they were then identified by immunofluorescence and induced into osteoblasts, adipocytes and neuroblasts *in vitro*. qPCR was used to detect the expression of Nestin, NT-3, and MANF after neural differentiation. HLA-ABC and HLA-DR expression in these three kinds of MSCs was quantitatively analyzed by flow cytometry. Finally, the number of living cells was calculated at 24, 48 and 72 hours after they were placed in the cell transport solution at room temperature.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The adipogenic ability of placenta-derived MSCs and the osteogenic capability of umbilical cord-derived MSCs were the best among three kinds of MSCs. All three kinds of cells expressed Nestin and GFAP, which are markers of neural stem cells. (2) NT-3 was highly expressed in umbilical cord-derived MSCs after neural induction, while MANF was highly expressed in placenta-derived MSCs after neural induction. They could be used to repair different types of nerve injuries. (3) The human amniotic fluid-derived MSCs were more suitable for allogeneic inoculation because they expressed HLA-ABC in a low level and did not express HLA-DR which showed the lowest possibility to cause immune rejection. (4) The survival rate of amniotic fluid-derived MSCs was the highest after a 72 hours induction in the cell transport fluid. In conclusion, as there is a slight difference in biological characteristics of human amniotic fluid, umbilical cord and placenta-derived MSCs, these three kinds of MSCs can be used for clinical treatment of different diseases.

**Subject headings:** Amniotic Fluid; Placenta; Umbilical Cord; Cell Proliferation; Cell Differentiation; Tissue Engineering

**Funding:** the Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Guangdong Provincial Department of Education, No. 2014KTSPT037; Open Platform for Basic Research and Application of Stem Cells, No. [2015]143; Academic Fund for Students in Foshan University

## 0 引言 Introduction

近年来, 干细胞生物学在再生医学领域的巨大治疗潜力, 已经引起了科技界和广大公众的关注<sup>[1]</sup>。干细胞是一类具有自我更新和多向分化能力的细胞。正是因为它的再生潜力和可塑性使得它广泛应用于再生医学和干细胞研究中<sup>[2]</sup>。干细胞为目前缺乏有效治疗方法的许多疾病带来希望, 包括脑卒中、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默病和帕金森病<sup>[3-4]</sup>。

间充质干细胞是从成年和胎儿组织分离的多能基质细胞, 被定义为黏附的成纤维细胞样细胞。间充质干细胞还具有内在的归巢能力, 可以迁移到损伤组织, 并积极参与组织修复<sup>[5-6]</sup>。此外, 间充质干细胞具有强大的免疫抑制功能和组织修复能力<sup>[7-8]</sup>, 在临床实践中应用广泛, 可以治疗风湿病和移植抗宿主病<sup>[9-10]</sup>。间充质干细胞虽然具有多能性, 但自我更新能力逐渐降低导致细胞分裂停滞, 在体外表现出有限的使用寿命, 限制了它在治疗上的应用<sup>[11]</sup>。与成年组织相比, 围产期组织来源间充质干细胞具有较低的突变风险, 并且表现出优异的细胞活性, 包括更大的分化、归巢和植入效力, 以及较低的免疫原性<sup>[11-15]</sup>。当前研究主要集中于间充质干细胞的分离、培养和治疗应用<sup>[4, 8]</sup>。不同来源的间充质干细胞具有相似甚至相同的表型, 但由于其独特的遗传特征、迁移能力、分离方法, 不同围产期组织来源间充质干细胞已被证明具有不同的治疗效果<sup>[16-17]</sup>。

实验选择人羊水干细胞(human amniotic fluid stem

cells, hAFSCs)、脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)和胎盘间充质干细胞(human placenta mesenchymal stem cells, hP-MSCs) 3种围产期组织来源的间充质干细胞, 对其体外增殖能力、多向分化能力、运输液中细胞活性、免疫学特性进行比较, 为临床针对不同疾病选取更加合适的间充质干细胞提供依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞水平体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年2至10月在佛山科学技术学院907实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 样本 羊水、脐带、胎盘组织均来自佛山妇幼保健院, 捐赠者均知情并签署同意书, 同意用于科研实验。采取随机采样, 选择健康孕妇的孕中期羊水以及健康产妇的胎盘、脐带组织。

1.3.2 实验试剂 0.25%胰蛋白酶、干细胞成骨分化液、干细胞成脂分化液(Gibico公司); 人羊水干细胞专用培养基(BI公司); 人脐带间充质干细胞培养基、人胎盘间充质干细胞培养基(赛业公司); Anti-CD34兔抗单克隆抗体、Anti-CD44鼠抗单克隆抗体、Anti-CD90/Thy1鼠抗多克隆抗体、Anti-HLA Class 1 ABC鼠抗多克隆抗体、Anti-HLA-DR兔抗多克隆抗体、Anti-Nestin鼠抗单克隆抗体、Anti-GFAP兔抗多克隆抗体(Abcam公司); CO<sub>2</sub>培养箱

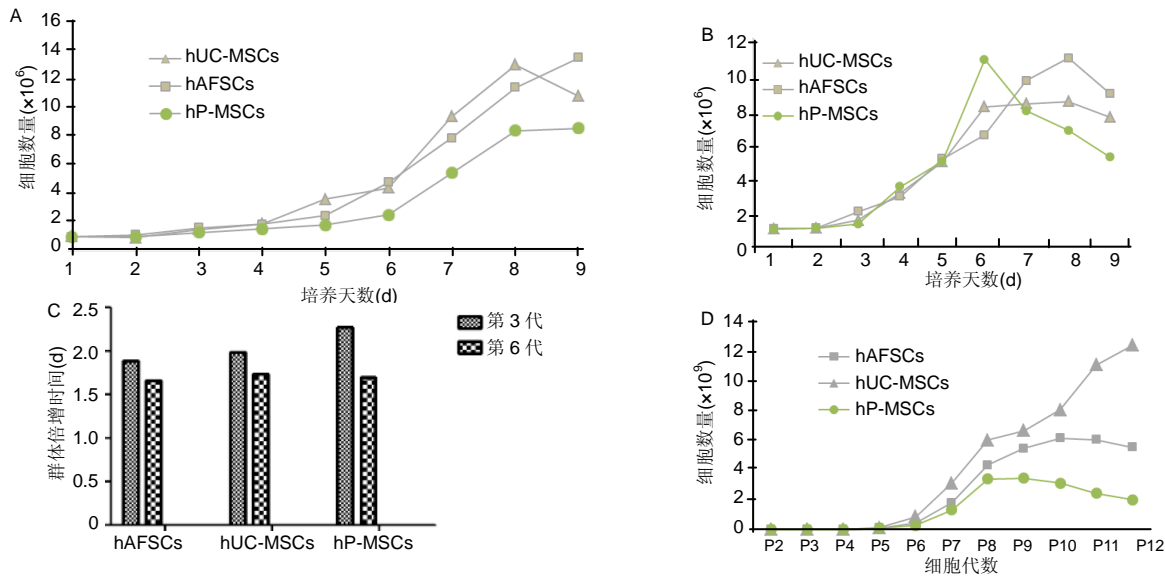


图1 人羊水干细胞(hAFSCs)、人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)和人胎盘间充质干细胞(hP-MSCs)的生长特性  
Figure 1 The growth characteristics of mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta  
图注: 图中A为第3代细胞生长曲线; B为第6代细胞生长曲线; C为第3代、第6代细胞的群体倍增时间; D为不同代次细胞数量。

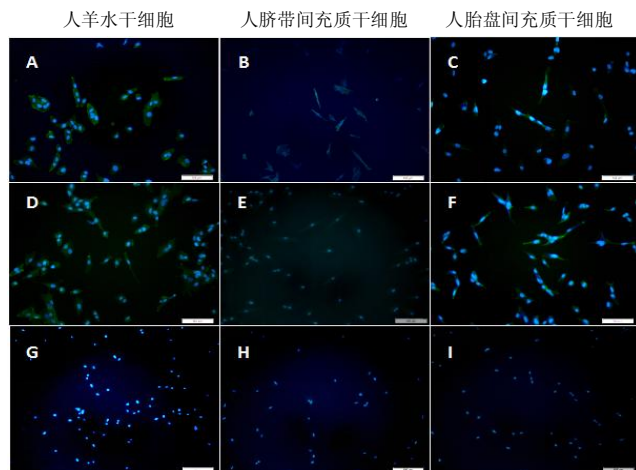


图2 人羊水干细胞、人脐带间充质干细胞、人胎盘间充质干细胞的特异性表面标记(免疫荧光染色, 标尺为100 μm, ×100)  
Figure 2 Immunofluorescence staining of specific surface markers of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta (scale bars=100 μm, ×100)  
图注: 3种细胞均表达 CD44(A-C)、CD90(D-F), 不表达 CD34(G-I)。

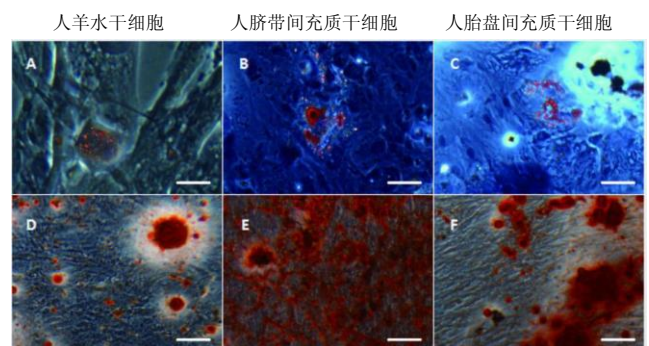


图3 人羊水干细胞、人脐带间充质干细胞、人胎盘间充质干细胞的成脂、成骨诱导分化能力  
Figure 3 Adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta  
图注: 3种细胞经油红O染色后, 可见胞浆内有被染红的脂滴(A-C, 标尺为200 μm); 3种细胞经茜素红染色后, 可见红色矿化沉着物(D-F, 标尺为100 μm)。

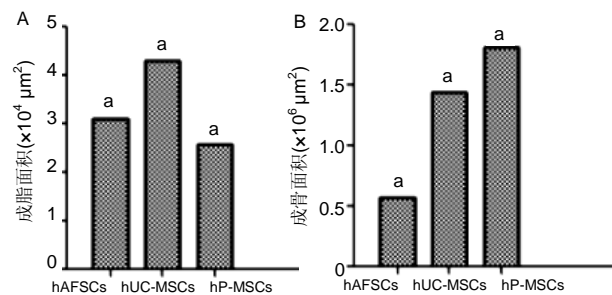


图4 人羊水干细胞(hAFSCs)、人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)、人胎盘间充质干细胞(hP-MSCs)的脂滴、钙结节面积  
Figure 4 Lipid droplet and calcium nodule area in mesenchymal stem cells from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta  
图注: 3种不同来源间充质干细胞的成脂、成骨面积两两组间相比较差异均有显著性意义( $^*P < 0.05$ )。

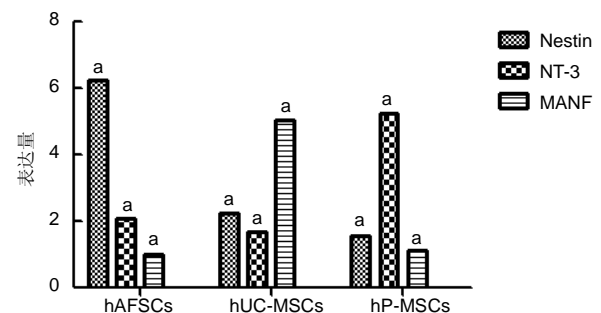


图6 人羊水干细胞(hAFSCs)、人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)、人胎盘间充质干细胞(hP-MSCs)内 Nestin、NT-3、MANF 的基因相对表达量  
Figure 6 Comparison of relative expression of Nestin, NT-3 and MANF gene in mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta  
图注: 3种细胞诱导分化后 Nestin、NT-3、MANF 的基因相对表达量两两组间比较差异均有显著性意义( $^*P < 0.05$ )。

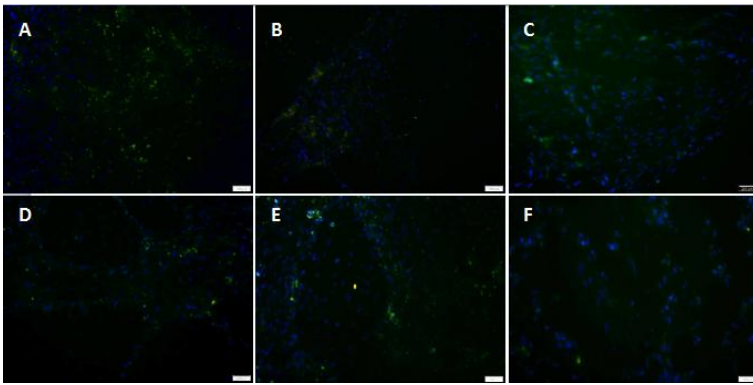


图5 成神经诱导后3种间充质干细胞的神经细胞表面标记表达(标尺为100 μm, ×100)

Figure 5 Immunofluorescence staining of surface markers of mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta after neural induction (scale bars=100 μm, ×100)

图注: 人羊水干细胞、人脐带间充质干细胞、人胎盘间充质干细胞经诱导后均表达神经干细胞标记物 Nestin(A-C)以及 GFAP(D-F)。

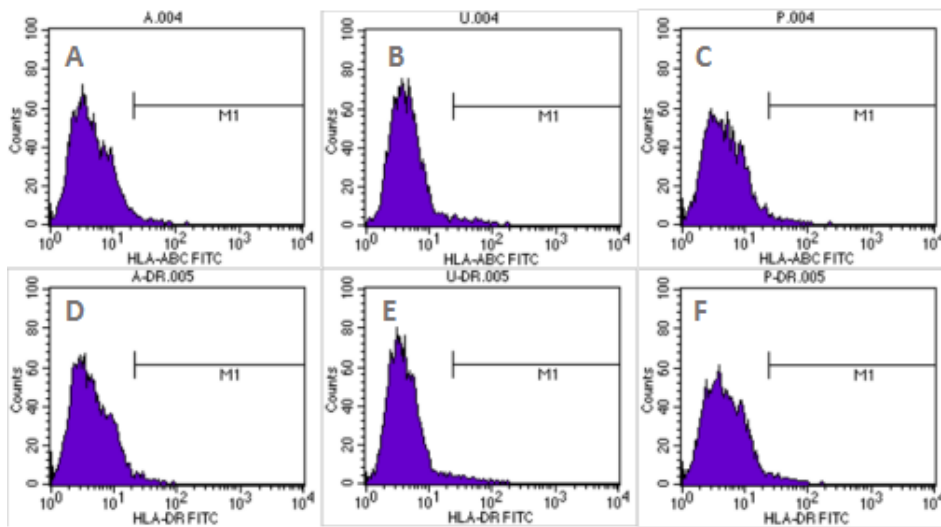


图7 流式细胞仪分析3种细胞的HLA-ABC、HLA-DR表达

Figure 7 Expression of HLA-ABC and HLA-DR in mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta detected by flow cytometry

图注: A-C 依次为人羊水干细胞、人脐带间充质干细胞、人胎盘间充质干细胞的 HLA-ABC 表达; D-F 依次为人羊水干细胞、人脐带间充质干细胞、人胎盘间充质干细胞的 HLA-DR 表达。

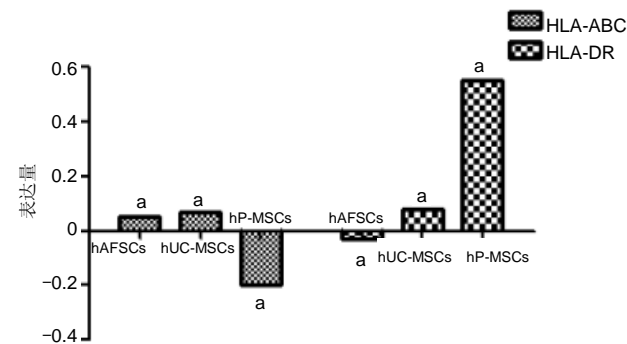


图8 人羊水干细胞(hAFSCs)、人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)、人胎盘间充质干细胞(hP-MSCs)HLA-ABC、HLA-DR 的表达

Figure 8 Expression of HLA-ABC and HLA-DR in mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta

图注: 3 种细胞的 HLA-ABC、HLA-DR 表达量两组间比较差异均有显著性意义( $^aP < 0.05$ )。

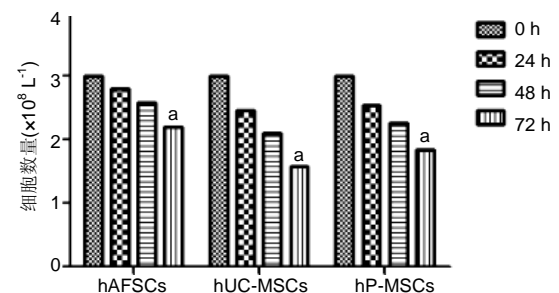


图9 人羊水干细胞(hAFSCs)、人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)、人胎盘间充质干细胞(hP-MSCs)在细胞运输液中常温放置 24, 48, 72 h 后的活细胞数量

Figure 9 The number of viable cells in the cell transport fluid of mesenchymal stem cells derived from human amniotic fluid, umbilical cord, and placenta after 24, 48, and 72 hours at room temperature

图注: 3 种细胞在细胞运输液中常温放置 72 h 后的活细胞数量两组间比较差异均有显著性意义( $^aP < 0.05$ )。

(SHEL LAB公司); 倒置荧光显微镜(CKX41, OLYMPUS 公司)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 hAFSCs 的分离培养 将羊水与含有 EDTA 的 PBS 按 1:1 稀释, 以 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入羊水专用培养基反复吹打混匀; 然后接种在明胶包被的培养皿, 置于 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

1.4.2 hUC-MSCs 的分离培养 将脐带剪开, 用 PBS 清洗数次后, 取出华通胶, 剪碎, 用含有 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化至液体浑浊, 加入含有体积分数为 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化, 用 200 目筛网过滤, 1 800 r/min 离心 10 min, 弃去上层液体, 留下底层细胞, 加入人脐带间充质干细胞培养基吹匀, 然后接种在明胶包被的培养皿, 置于 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

1.4.3 hP-MSCs的分离培养 剥除羊膜,取胎儿面胎盘组织,剪碎,用PBS清洗数次直至液体颜色变浅,加入II型胶原酶在37℃下消化30 min,用200目筛网过滤,1 800 r/min离心10 min,收集细胞沉淀,PBS重悬,吸取25 mL到装有15 mL淋巴细胞分离液的离心管中,800 r/min离心20 min,移取中间白膜层细胞于离心管中离心(1 800 r/min离心10 min),移弃上清,收集细胞沉淀,用胎盘间充质干细胞培养基重悬,混匀,接种于明胶包被过的细胞板,置于37℃、体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱培养。

1.4.4 细胞的生长特性以及群体倍增时间 对每一代的细胞进行数量计算,每一代的细胞按1:2传代,细胞长至90%~95%时消化计数,计算出每种细胞生长至平台期时可以获得获得的总细胞数。

取第3代、第6代hAFSCs、hUC-MSCs、hP-MSCs,以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种至明胶包被过的24孔板,于37℃,体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每间隔24 h对其中任意3个孔的细胞进行消化计数,然后以时间为横坐标,细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

细胞群体倍增时间(population double time, PDT)= $t \cdot \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ ,其中,t为细胞培养的时间(单位:h),N<sub>t</sub>是培养t时间后的细胞数量,N<sub>0</sub>是初始接种的细胞数量。

1.4.5 细胞的免疫荧光鉴定 取第3代hAFSCs、hUC-MSCs、hP-MSCs,接种至明胶包被过的24孔板,培养18 h细胞贴壁后,用40 g/L多聚甲醛固定,0.1% TritonX-100透化剂透化,体积分数为10%胎牛血清封闭,然后分别加入一抗(鼠抗CD44,1:200;兔抗CD34、CD90,1:100),4℃避光孵育过夜,加入对应的FITC标记的二抗(羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG,1:500),室温避光孵育30 min,加入DAPI避光复染后加入抗荧光淬灭剂,置于倒置显微镜下观察并拍照。

1.4.6 细胞的成骨、成脂、成神经分化能力

**成骨能力:**取第4代细胞,以每孔 $4.5 \times 10^4$ 个接种于24孔培养板。待细胞贴壁后,更换为成骨分化培养基,以后每3 d换液1次,观察到胞质中有钙结节形成时,使用茜素红染色鉴定。

**成脂能力:**取第4代细胞,以每孔 $2.5 \times 10^4$ 个接种于24孔培养板。待细胞贴壁后,更换为成脂分化培养基,以后每4 d换液1次,观察到胞质中有脂滴形成时,油红O染色鉴定。

**成神经能力:**取第4代细胞,以每孔 $2.5 \times 10^4$ 个接种于24孔培养板。待细胞贴壁后,先更换为含有N<sub>2</sub>添加剂、人碱性成纤维细胞生长因子、人表皮生长因子、L-谷氨酰胺、鸡胚提取物的F12培养基,每3 d换液1次,换液7次后更改为含有B27、胎牛血清的神经基础培养基,每3 d换液1次,培养14 d后进行免疫荧光鉴定。

1.4.7 实时荧光定量PCR检测成神经诱导后相关基因表达 取第5代细胞,使用RNAiso plus试剂提取细胞总

RNA,反转录获得cDNA,进行RT-PCR反应。按照引物序列及PCR试剂盒说明书完成PCR反应体系;β-actin作为内参,通过2<sup>-ΔΔCt</sup>法,对各组基因表达量进行统计。引物均根据设计原则准确设计,并在NCBI基因数据库中比对无误,由上海生工生物工程股份有限公司合成,见表1。

表1 间充质干细胞表达的qPCR引物序列表  
Table 1 Primer sequences used for qPCR analysis of gene expression in mesenchymal stem cells

名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
Nestin	F: CCT TGC CTG CTA CCC TTG AGA	195	60
	R: CCT GTT TCC TCC CAC CCT GT		
NT-3	F: CCC GCC CTT GTA TCT CAT GG	141	60
	R: TCG GTC ACC CAC AGA CTC TCA		
MANF	F: TGT CAC ATT CTC ACC AGC CAC T	250	60
	R: GTC CAC TGT GCT CAG GTC GAT		

1.4.8 流式细胞仪检测细胞表面抗原分子 取第4代细胞,调整细胞浓度至 $(1.0-2.0) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,分为每管0.1 mL,分别加入抗体HLA-ABC(MHC-I类分子)、HLA-DR(MHC-II类分子)以及对应的同型IgG1、IgG2对照各20 μL,室温反应30 min,流式细胞仪计数5 000~10 000个细胞。

1.4.9 细胞的体外常温储存 调整第4代细胞的细胞浓度至 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,分别放入细胞储存液(含海藻糖、肝素钙等,专利号201810310574.7),每间隔24 h将细胞液吹打均匀后取300 μL记录活细胞数。

1.5 主要观察指标 ①3种细胞的生长增殖能力;②3种细胞的成脂、成骨、成神经分化能力;③3种细胞的免疫相容性抗体HLA-ABC、HLA-DR表达量;④3种细胞在细胞运输液中常温放置24, 48, 72 h后的活细胞数量。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行分析,两独立样本比较采用独立样本t检验,不同组间比较采用单因素方差分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,P<0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 细胞生长曲线、细胞可获得数量以及群体倍增时间 第3代hUC-MSCs的生长速度较快,但是传至第6代时,hAFSCs增殖速度明显快于hUC-MSCs,hP-MSCs生长速度最慢(图1A、B),经多次传代纯化后,第6代细胞群体倍增时间更低(图1C)。

假设第1代能获得 $1 \times 10^6$ 个细胞(不同羊水样本的密度、脐带样本的长短和粗细、胎盘样本的大小和质量不能保证完全一致,所以不选择这些因素做比较),统计第1~12代可获得的细胞总数(图1D),可知hUC-MSCs的生长速度较快,hAFSCs次之,hP-MSCs最慢。

2.2 细胞的特异性表面标记鉴定和成脂、成骨分化能力 3种细胞均表达CD44(图2A-C)、CD90(图2D-F),不表达

### CD34(图2G-I)。

hP-MSCs在成脂诱导17 d发现有少许脂滴, hAFSCs、hUC-MSCs均在成脂诱导19 d时出现少许脂滴。在第21天进行油红O染色, 可见胞浆内有被染红的脂滴, 分别对染色后有明显红色脂滴的视野进行拍照(图3A-C), 经Image ProPlus软件分析成脂部分的面积(即成脂能力): hUC-MSCs>hAFSCs>hP-MSCs(图4)。

3种细胞在成骨诱导约1周时逐渐由长梭形变为方形、鳞片形。hP-MSCs、hUC-MSCs、hAFSCs分别在14, 16, 19 d出现钙结节, 在第21天进行茜素红染色, 可见红色矿化沉着物(图3C-E), 每组随机选取6个不同视野的照片, 经Image ProPlus软件分析成骨部分的面积(即成骨能力): hP-MSCs>hUC-MSCs>hAFSCs(图4)。

**2.3 细胞的神经分化能力** 3种细胞经诱导后均表达神经干细胞标记物Nestin以及GFAP(图5)。经诱导后3种细胞Nestin、NT-3、MANF基因表达均上升且差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), hP-MSCs的NT-3基因表达显著升高, hUC-MSCs的MANF基因表达较其他2种细胞升高明显(图6)。

**2.4 细胞免疫相容性抗体HLA-ABC、HLA-DR的表达** 低表达HLA-ABC、HLA-DR可显示出间充质干细胞具有较低的免疫排斥反应。选取第4代3种细胞进行流式细胞仪分析HLA-ABC、HLA-DR以及对应的同型对照IgG1、IgG2的表达(图7, 8), 结果显示HLA-ABC的表达量hUC-MSCs>hAFSCs>hP-MSCs, HLA-DR的表达量hP-MSCs>hUC-MSCs>hAFSCs。

**2.5 3种细胞在运输液内常温放置的活细胞数量** 在室温放置24, 48, 72 h后, 计算活细胞数量(图9), 可见hAFSCs更适合于储存液的运输, 3 d后细胞数量可达到73%。

## 3 讨论 Discussion

间充质干细胞的治疗潜力取决于细胞来源, 与成年组织相比, 围产期来源的间充质干细胞具有非侵入性和无创性, 且无道德、伦理问题, 在细胞增殖、免疫抑制方面有明显优势<sup>[13, 18]</sup>。该研究旨在比较3种类型的新生儿围产期组织来源间充质干细胞在临床治疗使用中的优势。实验首先成功分离得到了hAFSCs、hUC-MSCs、hP-MSCs, 细胞呈长梭形, 贴壁生长, 其中hUC-MSCs、hP-MSCs两者形态较为相似, 平行排列呈漩涡生长, hAFSCs排列较为无序。然后对3种细胞进行细胞表面标记物及多向分化能力鉴定, 3种细胞均表达CD44、CD90, 不表达CD34, 在诱导分化培养基下, 均有成脂肪、成骨、成神经细胞分化能力。

目前针对间充质干细胞的临床使用中, 出现频率最高的是人骨髓间充质干细胞, 但是获取骨髓是有创的, 以及伦理道德问题, 严重影响了骨髓间充质干细胞治疗在临床上的推进<sup>[19]</sup>, 因此围产期组织来源间充质干细胞受到广泛

关注。在肝衰竭、脱发等疾病治疗时, 脂肪细胞是必不可缺少的, hUC-MSCs的成脂能力明显优于其他两者, 可以在需要脂肪细胞生成的疾病治疗中优先考虑使用hUC-MSCs, 以更快达到治疗效果。Pu等<sup>[15]</sup>实验中提出鉴于hUC-MSCs的低免疫排斥能力, 是再生医学中的良好的细胞来源。通过3种细胞对比发现, hP-MSCs的成骨能力较好, 由此推测以hP-MSCs为种子细胞构建的组织工程骨可能会成为一种人工替代骨用于骨缺损的修复重建(先天性骨缺损、骨肿瘤、创伤等)。hAFSCs生长速度较快, 群体倍增时间较短, 在细胞运输过程中存活率高, 在需要大量细胞的疾病治疗中, 可以选择使用hAFSCs, 可以在远距离运送细胞过程中利用更短时间获得所需的数量。流式细胞分析中展现出了hAFSCs在异体移植时具有很大优势, 低表达HLA-ABC并且不表达HLA-DR, 避免了异体接种时被免疫系统识别产生的免疫排斥反应。在以后的临床实验中, 更加推荐使用生长速度快、异体接种无免疫排斥反应, 且具有诱导分化为脂肪细胞、骨细胞、神经细胞的hAFSCs。

3种细胞经成神经诱导分化后均表达神经干细胞标记物Nestin以及GFAP。体外研究表明, NT-3对交感神经元、感觉神经元、大脑皮质的上运动神经元、脊髓前角运动神经元以及大脑基底部的乙酰胆碱能神经元等均有维持存活的生物学作用<sup>[20]</sup>。诱导后的hAFSCs中NT-3表达量较高, 将hAFSCs成神经诱导后治疗神经疾病, 为损伤的神经细胞提供所需要的营养物质或生长因子的可能性较大。MANF在脑缺血损伤中, 可减少脑梗死体积, 促进行为恢复, 对于改善脑卒中中长期预后具有重要意义<sup>[21]</sup>, 对于此类疾病可以考虑使用经成神经诱导后高表达MANF的hUC-MSCs。

目前大量的实验方向倾向于对各种间充质干细胞生物学特性进行简单比较, 该实验检测出成脂滴、钙结节的面积, 直观展示出3种不同围产期来源间充质干细胞的体外分化能力, qPCR分析跨胚层分化为神经细胞的能力, 也计算出可以在临床使用的细胞数量, 同时定量表现出免疫相容性抗体的表达量, 为临床应用提供理论依据。

**致谢:** 感谢实验样本提供单位佛山妇幼保健院, 感谢提供试验样品的捐赠者及其家人。

**作者贡献:** 实验设计为陈志胜、赵姝灿; 实验实施为赵姝灿; 实验评估为王丙云、陈胜锋; 样本收集为郑桂纯、林莲莲、梅展图; 文章校对为郑桂纯。

**经费支持:** 该文章接受了“广东省教育厅预防兽医学重点实验室项目(2014KTSPT037)”、“干细胞基础研究与应用开放平台(佛财工[2015]143号)”、“佛山科学技术学院学生学术基金项目”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究的实施符合佛山科学技术学院的相关伦理要求。

**知情同意问题:** 羊水、脐带、胎盘组织均来自佛山妇幼保健院, 捐赠者均知情并签署同意书, 同意捐赠用于科研实验。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过佛山科学技术学院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Macrin D, Joseph JP, Pillai AA, et al. Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence. *Stem Cell Rev.* 2017;13(6):741-756.
- [2] Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Pashaei-Asl F, Fardiyazar Z, et al. Isolation, Characterization, Cryopreservation of Human Amniotic Stem Cells and Differentiation to Osteogenic and Adipogenic Cells. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158281.
- [3] Bonaventura G, Chamayou S, Liprino A, et al. Different Tissue-Derived Stem Cells: A Comparison of Neural Differentiation Capability. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140790.
- [4] Wang LT, Ting CH, Yen ML, et al. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci.* 2016;23(1):76.
- [5] Collins E, Gu F, Qi M, et al. Differential efficacy of human mesenchymal stem cells based on source of origin. *J Immunol.* 2014;193(9):4381-4390.
- [6] Li X, Bai J, Ji X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* 2014;34(3):695-704.
- [7] Janowski M, Lyczek A, Engels C, et al. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33(6):921-927.
- [8] Araújo AB, Salton GD, Furlan JM, et al. Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy.* 2017;19(5):577-585.
- [9] Rui K, Lin X, Tian J, et al. Ecto-mesenchymal stem cells: a new player for immune regulation and cell therapy. *Cell Moll Immunol.* 2018;15(1):82-84.
- [10] Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(10):584-594.
- [11] Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, et al. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol.* 2016;44(2):138-150.
- [12] Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, et al. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology.* 2015;71(2):181-197.
- [13] Danišovič L, Boháč M, Zamborský R, et al. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *Gen Physiol Biophys.* 2016;35(2):207-214.
- [14] Martinelli D, Pereira RC, Moggi M, et al. A humanized system to expand in vitro amniotic fluid-derived stem cells intended for clinical application. *Cytotherapy.* 2016;18(3):438-451.
- [15] Pu L, Meng M, Wu J, et al. Compared to the amniotic membrane, Wharton's jelly may be a more suitable source of mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering and clinical regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):72.
- [16] Hass R, Kasper C, Böhm S, et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9:12.
- [17] von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(4):557-564.
- [18] Xiao B, Rao F, Guo ZY, et al. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res.* 2016; 11(7):1172-1179.
- [19] Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem.* 2006;97(4):744-754.
- [20] 闫宇辉, 李少恒, 孔亮, 等. NT-3 高表达促进神经干细胞向胆碱能神经元分化[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(5):631-637.
- [21] 魏洁, 刘东方, 王葱. 中脑星形胶质细胞源性神经营养因子[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(4):390-394.