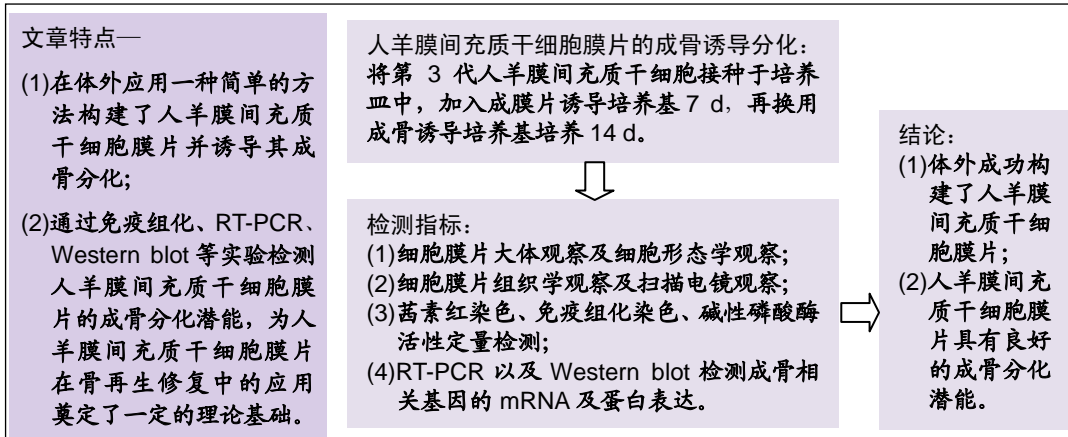


体外构建人羊膜间充质干细胞膜片及成骨分化潜能

邹刚¹, 尤奇¹, 沈梦杰², 张骏¹, 汤井洋¹, 金瑛¹, 刘毅¹ (1遵义医科大学附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000; 2遵义医科大学附属口腔医院, 贵州省遵义市 550002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2104 ORCID: 0000-0003-2163-3897(邹刚)

文章快速阅读:



邹刚, 男, 1979 年生, 贵州省金沙县人, 汉族, 2012 年遵义医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨组织工程研究。

并列第一作者: 尤奇, 男, 1989 年生, 安徽省颍上县人, 汉族, 2019 年遵义医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨组织工程、运动医学研究。

通讯作者: 刘毅, 博士, 主任医师, 遵义医科大学附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000

文题释义:

细胞膜片技术: 该技术避免了蛋白酶的消化和外源性支架材料的应用, 通过细胞外基质分泌形成膜片组织, 然后将膜片用于修复组织缺损和改善器官功能。该技术保留了大量自体细胞分泌的细胞外基质, 为细胞的增殖和分化提供与体内极度相似的微环境, 目前该技术已经用于临床眼角膜和食管损伤的修复。

人羊膜间充质干细胞: 取自于废弃的胎盘, 贴壁生长, 具有低免疫原性和生长周期短等特点, 不仅具有成体间充质干细胞的特性还具有部分胚胎间充质干细胞的特性。

摘要

背景: 人羊膜间充质干细胞属于成体干细胞, 其来自于废弃的胎盘, 来源广泛, 可以无创获取, 具有免疫原性低、生长周期短等特点, 是组织工程种子细胞的重要来源, 目前人羊膜间充质干细胞已经用于临床糖尿病的治疗。

目的: 探索一种简便的方法构建人羊膜间充质干细胞膜片, 并研究其成骨分化潜能。

方法: 将第 3 代人羊膜间充质干细胞高密度接种于普通培养皿中, 加入成膜片诱导培养基以构建人羊膜间充质干细胞膜片, 通过组织学染色以及扫描电镜观察细胞膜片的特性。取第 3 代人羊膜间充质干细胞高密度接种于培养皿中, 加入成膜片诱导培养基培养 7 d, 再换用成骨诱导培养基培养 14 d 以构建成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片。通过茜素红染色、免疫组化染色、碱性磷酸酶活性、RT-PCR 以及 Western blot 检测人羊膜间充质干细胞膜片的成骨分化潜能。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色可见人羊膜间充质干细胞膜片由多层细胞累积而成, 细胞分布均匀; ②扫描电镜观察可见人羊膜间充质干细胞膜片呈复层结构, 胞外有大量的胞外基质产生, 细胞包埋于胞外基质中; ③人羊膜间充质干细胞膜片成骨诱导 14 d, 茜素红染色后可见橘红色沉淀, 免疫组化染色后细胞周围有大量 I 型胶原产生; ④与未诱导的人羊膜间充质干细胞膜片相比, 成骨诱导 14 d 后人羊膜间充质干细胞膜片碱性磷酸酶活性显著升高 ($P < 0.01$), I 型胶原、骨钙蛋白、Runt 相关转录子 2 的 mRNA 和蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$); ⑤该实验应用一种简便、经济的方法在普通培养皿上成功构建了人羊膜间充质干细胞膜片, 体外研究证实人羊膜间充质干细胞膜片具有良好的成骨分化潜能。

关键词:

人羊膜间充质干细胞; 细胞膜片; 成骨诱导; 骨组织工程

中图分类号: R459.9; R318; R681

基金资助:

贵州省科技厅联合基金(黔科合 LH 字【2017】7015 号), 项目负责人: 邹刚

In vitro construction of human amniotic mesenchymal stem cell sheet and its osteogenic differentiation

Zou Gang¹, You Qi¹, Shen Mengjie², Zhang Jun¹, Tang Jingfeng¹, Jin Ying¹, Liu Yi¹ (1Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; 2Hospital of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 550002, Guizhou Province, China)

文献标识码: B

投稿日期: 2020-01-02

送审日期: 2020-01-14

采用日期: 2020-03-03

在线日期: 2020-04-07



Zou Gang, Master, Associate chief physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

You Qi, Master, Physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Zou Gang and You Qi contributed equally to this work.

Corresponding author: Liu Yi, MD, Chief physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) are a kind of adult stem cells that can be extracted from discarded placenta. Compared with other mesenchymal stem cells, hAMSCs have many advantages such as noninvasive isolation, low immunogenicity and short growth cycle, and thus hAMSCs are an important source of tissue engineering seed cells. Currently, hAMSCs have been applied in the clinical treatment of diabetes.

OBJECTIVE: To explore a simple method to fabricate hAMSC sheets and to study their potential to differentiate into osteocytes.

METHODS: Passage 3 hAMSCs were seeded into culture plates at a high density, and the sheet-forming medium was added to fabricate hAMSC sheet. The structural characteristics of hAMSC sheets were evaluated by histological staining and scanning electron microscopy. The sheet-forming induction medium was added to the passage 3 hAMSCs for 7 continuous days, and then replaced by the osteogenic induction medium for 14 days to construct osteogenic-induced hAMSC sheets. The potential for osteogenic differentiation of hAMSC sheets was assessed by alizarin red staining, immunohistochemical staining, alkaline phosphatase activity, RT-PCR, and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining results indicated that hAMSC sheets had a multi-layered structure with the cells stacked layer-by-layer and evenly distributed. Under the scanning electron microscope, the hAMSC sheets had a multi-layered structure, and a large amount of extracellular matrices that enveloped the fusiform cells were produced. After 14 days of osteogenic induction, orange-red precipitation was observed by alizarin red staining. Immunohistochemical staining results showed a large amount of type II collagen. Compared with non-induced hAMSC sheet, alkaline phosphatase activity was significantly increased in the osteogenic induced sheet ($P < 0.01$). The expression levels of type I collagen, osteocalcin, and Runt-related transcript factor 2 mRNA and protein were significantly higher in the osteogenic-induced hAMSC sheet group than the non-induced hAMSC sheet group ($P < 0.05$). Our findings indicate that this is a simple and economic method to construct the hAMSC sheets in the normal culture medium. Moreover, hAMSC sheets have a good osteogenic differentiation potential that has been confirmed *in vitro*.

Key words: human amniotic mesenchymal stem cells; cell sheet; osteogenic differentiation; bone tissue engineering

Funding: the Joint Fund of Guizhou Provincial Science and Technology Department, No. [2017]7015 (to ZG)

0 引言 Introduction

目前, 骨缺损的再生修复仍然困扰着广大临床医生和科研工作者, 传统骨缺损的治疗方法主要有自体骨移植、异体骨移植、骨段延长技术等, 但以上方法均有其自身的局限性, 常常导致临床效果不满意^[1-2]。随着骨组织工程的不断发展, 研究者们正积极寻找能够修复损伤骨组织的种子细胞和支架材料。近年来, 人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)越来越受到研究者的重视, 其取自于废弃的胎盘, 可以无创获取, 也不存在伦理道德争议, 而且人羊膜间充质干细胞的增殖能力要强于骨髓间充质干细胞, 具有高纯度、低免疫原性等特点^[3-5]。1993年日本学者OKANO提出了细胞膜片技术, 该技术避免了胰酶的消化和使用支架材料, 通过分泌大量的胞外基质形成膜片组织, 然后将膜片直接用于修复组织损伤和改善器官功能^[6]。目前, 人羊膜间充质干细胞应用于骨组织损伤修复的研究还相对较少, 该研究拟采用一种简便、有效的方法构建人羊膜间充质干细胞膜片, 并观察其向成骨方向分化的潜能, 以期为骨组织工程提供新的种子细胞, 同时为骨组织损伤修复提供一种新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年11月至2019年10月在遵义医科大学免疫学实验室完成。

1.3 材料 实验收集的5个胎盘来自于遵义医科大学附属医院产科足月产产妇, 术前无其他基础疾病, 术前均签署知情同意书, 符合遵义医科大学附属医院伦理委员会要求。

实验试剂及仪器: 低糖DMEM/F12培养基(美国Gibco公司); 高糖DMEM培养基(美国Gibco公司); 胎牛血清(美国Gibco公司); 碱性成纤维细胞生长因子(美国PEPROTECH公司); 维生素C(北京Solarbio公司); 丙酮酸

钠(北京Solarbio公司); 反转录试剂盒、SYBR Premix EXTaptTM试剂盒(日本Takara公司); 实时荧光定量PCR仪(美国BIO-RAD公司); 倒置相差显微镜(日本Nikon公司); 荧光显微镜(日本OLYMPUS公司); 扫描电镜(德国Zeiss公司)。

1.4 方法

1.4.1 构建人羊膜间充质干细胞膜片 采用机械-酶消化法分离、培养人羊膜间充质干细胞^[6], 应用流式细胞术和免疫荧光鉴定第3代人羊膜间充质干细胞表型。取第3代人羊膜间充质干细胞以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于6孔板中, 每孔中加入3 mL完全培养基(含体积分数10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素双抗液的低糖DMEM/F12培养基)培养, 3 d后去掉原培养基, 加入成膜片诱导培养基(含体积分数20%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素双抗液、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠、50 mg/L维生素C、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 成纤维细胞生长因子的低糖DMEM/F12培养基), 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养, 每隔2 d换液1次, 连续培养14 d以构建人羊膜间充质干细胞膜片。

1.4.2 构建成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片 取第3代人羊膜间充质干细胞以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于6孔板中, 每孔加入3 mL完全培养基, 3 d后去掉原培养基加入成膜片诱导培养基, 培养7 d后换为成骨诱导培养基(含体积分数10%胎牛血清、100 nmol/L地塞米松、1%青霉素-链霉素双抗液、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.05 mmol/L维生素C的高糖DMEM培养基)培养, 每隔2 d换液1次, 连续培养14 d以构建成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片。

1.5 主要观察指标

1.5.1 人羊膜间充质干细胞膜片的细胞形态学观察、组织学观察以及扫描电镜检测 ①倒置相差显微镜下观察人羊膜间充质干细胞膜片的细胞形态、分布以及生长情况; ②将成膜片诱导14 d的人羊膜间充质干细胞膜片用体积分数

为75%乙醇固定，制作厚度为5 μm的石蜡切片，进行苏木精-伊红染色；③成膜片诱导14 d的人羊膜间充质干细胞膜片用戊二醛固定，扫描电镜观察膜片的结构、细胞形态以及细胞外基质的分泌。

1.5.2 成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片茜素红染色以及免疫组化检测 ①随机选取培养状态良好的成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片，PBS冲洗3次，2 min/次，40 g/L多聚甲醛固定30 min，PBS冲洗3次，5 min/次，茜素红染液染色5 min，光学显微镜下观察；②随机选取培养状态良好的成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片，PBS冲洗3次，2 min/次，40 g/L多聚甲醛固定30 min，PBS冲洗3次，5 min/次，滴加兔抗人多克隆 I 型胶原抗体(1:200) 4 ℃过夜，滴加兔通用型二抗室温30 min，加入DAB显色，显微镜下观察出现棕色即终止，显微镜下观察、拍照。

1.5.3 成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片碱性磷酸酶活性定量检测 取培养状态良好的人羊膜间充质干细胞膜片和成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片，PBS冲洗3次，2 min/次，加入0.25% Triton X-100，充分裂解后离心取上清，应用碱性磷酸酶定量试剂盒行碱性磷酸酶活性定量检测，通过检测510 nm吸光度增加速率计算碱性磷酸酶活性。

1.5.4 成骨相关mRNA以及相应蛋白的表达 ①实时荧光定量PCR检测成骨相关基因mRNA表达水平：随机选取培养状态良好的人羊膜间充质干细胞膜片和成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片，用Trizol提取细胞RNA，紫外分光光度计检测RNA提取量，将反转录得到的cDNA模板进行荧光定量PCR检测。以GAPDH为内参，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因相对表达量。引物在NCBI基因库中进行比对，由上海生物工程股份有限公司合成，见表1。②Western blot检测成骨相关蛋白的表达：随机选取培养状态良好的人羊膜间充质干细胞膜片和成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片，加入裂解液冰上裂解45 min，离心获取上清液，利用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度，煮沸7 min，-80 ℃保存备用，避免反复冻融，应用10%的分离胶进行SDS-PAGE电泳，通过湿转法将蛋白转至PVDF膜上，封闭，加入骨钙蛋白、I型胶原、Runt相关转录因子2抗体以及β-actin内参抗体，4 ℃反应过夜，加入二抗，显色成像，对目的条带的灰度值进行量化和分析。

表1 基因引物序列及产物长度

Table 1 The primer sequences and product length of genes

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
I型胶原	上游: CTA AAG GTG CCA ATG GTG CT	125
	下游: ACC AGG TTC ACC GCT GTT AC	
骨钙蛋白	上游: GGA TTG AGC TCA CAC ACC T	129
	下游: CTA CCT GTA TCA ATG GCT GGG	
Runt相关转录因子2	上游: CCG CCT CAG TGA TTT AGG GC	132
	下游: GGG TCT GTA ATC TGA CTC TGT CC	
β-actin	上游: TGG CAC CCA GCA CAA TGA A	186
	下游: CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A	

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0统计软件分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，首先将数据进行Kolmogorov-Smirnov检验，当数据服从正态分布时，两组间比较采用独立样本t检验，以 $\alpha=0.05$ 为检验水准， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义，每个实验重复3次。

2 结果 Results

2.1 人羊膜间充质干细胞膜片大体形态及细胞形态 人羊膜间充质干细胞成膜片诱导14 d后，6孔板底部可见一层厚薄均匀的白色细胞膜片，倒置相差显微镜下观察可见长梭形细胞紧密排列，纵横交错，分布均匀，见图1。

2.2 人羊膜间充质干细胞膜片组织学观察及扫描电镜检测结果 石蜡切片苏木精-伊红染色显示：膜片由3-5层细胞堆积而成，细胞分布均匀，细胞外有大量胞外基质分泌，见图2A。扫描电镜观察结果显示：细胞膜片呈复层结构，梭形的细胞分泌大量细胞外基质，细胞被细胞外基质所包裹并逐渐融合，见图2B, C。

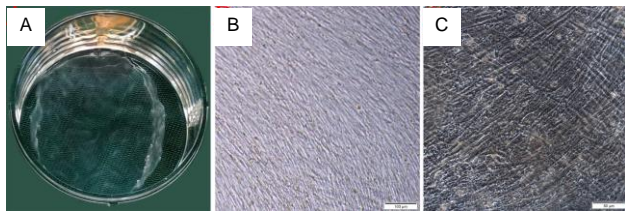
2.3 成骨诱导人羊膜间充质干细胞膜片茜素红染色、免疫组化及碱性磷酸酶活性定量检测结果 人羊膜间充质干细胞膜片成骨诱导14 d后，细胞体积增大，随着诱导时间的延长逐渐形成矿化结节，茜素红染色后可见橘红色沉淀。免疫组化结果显示：细胞周围有大量I型胶原产生，且细胞聚集处着色更明显。与未诱导的人羊膜间充质干细胞膜片相比，成骨诱导14 d后人羊膜间充质干细胞膜片碱性磷酸酶活性明显升高($P < 0.01$)，见图3。

2.4 成骨相关基因mRNA以及相应蛋白的表达 RT-PCR结果显示：与人羊膜间充质干细胞膜片组相比，成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片组I型胶原、骨钙蛋白、Runt相关转录因子2 mRNA表达量显著增高，差异有显著性意义($P < 0.05$)。Western blot结果显示：与人羊膜间充质干细胞膜片相比，成骨诱导的人羊膜间充质干细胞膜片组I型胶原、骨钙蛋白、Runt相关转录因子2蛋白表达均有不同程度增高，差异有显著性意义($P < 0.05$)，见图4。

3 讨论 Discussion

近年来，对于人羊膜间充质干细胞的研究引起了广大科研工作者的兴趣。LI等^[6]报道了人羊膜间充质干细胞具有多向分化的潜能。PAROLINI等^[7]报道了人羊膜间充质干细胞低表达主要组织相容性I类抗原(HLA-A、HLA-B、HLA-C)，同时低表达共刺激分子(CD80、CD83、CD86等)，也可减少白细胞介素的表达。LI等^[6]证实人羊膜间充质干细胞低表达免疫因子CD11B、CD19及主要组织相容性II类抗原HLA-DR^[6]。目前人羊膜间充质干细胞已经应用于多种组织损伤的修复^[8-10]，具有抗炎和神经修复功能^[11]。此外，应用人羊膜间充质干细胞治疗糖尿病已处于临床研究阶段^[12]。

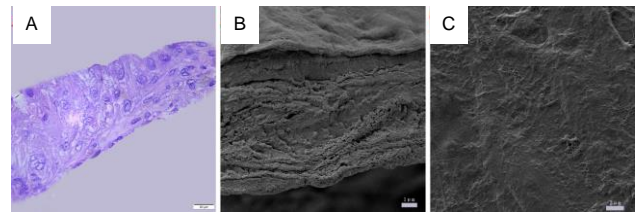
细胞膜片技术多利用温敏型聚合物-聚N异丙基丙烯酰胺对培养皿进行涂层处理，避免了胰酶的消化，可以获得较为完整的细胞膜片，从而用于组织工程构建，但是有研究报道应用温敏型培养皿制备的细胞膜片可能会影响细胞的聚合、分化^[13-14]。目前构建细胞膜片的方法有电反应



图注: 图中 A 为人羊膜间充质干细胞膜片大体观; B, C 分别为放大 100 倍和 200 倍倒置相差显微镜下人羊膜间充质干细胞膜片, 可见长梭形细胞紧密排列, 纵横交错, 分布均匀

图 1 人羊膜间充质干细胞膜片大体形态及细胞形态

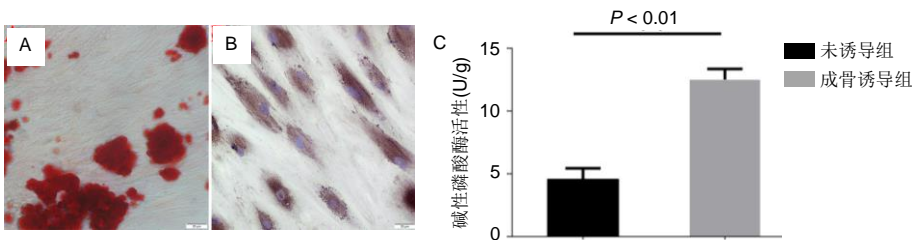
Figure 1 Gross and morphological observation of human amniotic mesenchymal stem cell sheets



图注: 图中 A 为石蜡切片苏木精-伊红染色($\times 400$), 可见膜片由 3-5 层细胞堆积而成, 细胞分布均匀, 细胞外有大量胞外基质分泌; B, C 分别为放大 3 000 倍和 5 000 倍扫描电镜下观察, 可见细胞膜片呈复层结构, 梭形的细胞分泌大量细胞外基质, 细胞被细胞外基质所包裹并逐渐融合

图 2 人羊膜间充质干细胞膜片组织学观察及扫描电镜检测

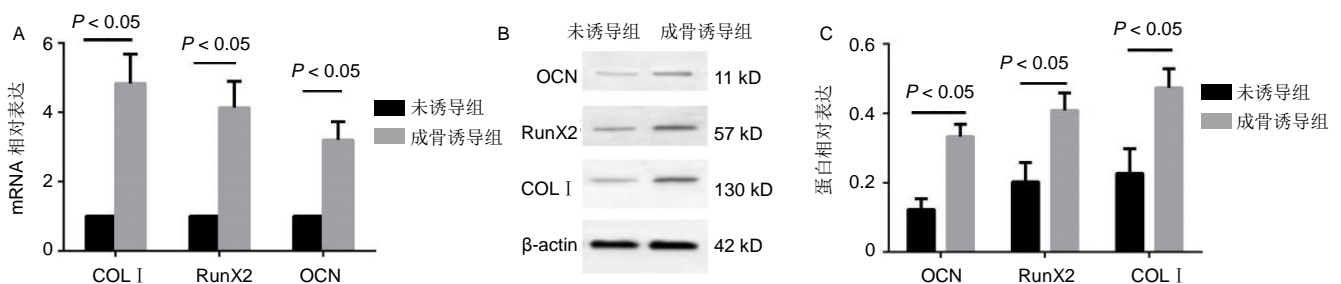
Figure 2 Histological observation and scanning electron microscope detection of human amniotic mesenchymal stem cell sheets



图注: 图中 A 为茜素红染色($\times 400$), 可见橘红色沉淀; B 为 I 型胶原免疫组化染色($\times 400$), 可见细胞周围有大量 I 型胶原产生, 且细胞聚集处着色更明显; C 为碱性磷酸酶活性定量检测

图 3 成骨诱导人羊膜间充质干细胞膜片茜素红染色、免疫组化染色及碱性磷酸酶活性定量检测

Figure 3 Alizarin red staining, immunohistochemistry staining, and alkaline phosphatase activity detection of osteogenic-induced human amniotic mesenchymal stem cell sheets



图注: 图中 A 为成骨诱导前后人羊膜间充质干细胞膜片成骨相关基因的 mRNA 表达 ($P < 0.05$); B, C 分别为成骨诱导前后人羊膜间充质干细胞膜片成骨相关基因蛋白表达。OCN: 骨钙蛋白; RunX2: Runt 相关转录因子 2; COL I: I 型胶原

图 4 成骨诱导前后人羊膜间充质干细胞膜片成骨相关基因的 mRNA 以及蛋白表达

Figure 4 Osteogenic-associated mRNA and protein expressions of human amniotic mesenchymal stem cell sheets before and after osteogenic induction

系统、磁反应系统、光反应系统以及 pH 系统, 以上方法均有其自身的局限性, 电反应系统涂层材料会影响细胞黏附生长^[15-16], 磁反应系统只能形成多层膜片的复合结构^[17], 光反应系统细胞膜片分离困难^[18-19], pH 系统细胞容易受损, 膜片难以分离^[20-21]。该研究中细胞膜片的培养和获取不需要特殊的材料, 可以通过机械方法获得, 操作简便。实验将人羊膜间充质干细胞接种到普通培养皿中, 经过体外成膜片诱导培养 14 d 成功构建了人羊膜间充质干细胞膜片。苏木精-伊红染色可以见到该膜片由 3-5 层细胞结构组成, 细胞分布较为均匀, 扫描电镜观察可以见到膜片呈复层结构, 胞外有大量细胞外基质分泌。TAKAGI 等^[22]报道了间充质干细胞膜片中含有骨形成蛋白、WNT 相关因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β 等细胞因子。该研究中通过机械方法获得细胞膜片, 避免了酶的消化过程, 可

以保留天然细胞外基质中的细胞因子。此外, 有研究显示在软骨损伤数小时后转化生长因子 β 和骨形成蛋白信号通路^[23-24]、WNT 信号通路的激活会促进骨软骨的修复和胞外基质的合成^[25]。目前, 细胞膜片技术已经广泛应用于组织再生修复研究, 其中将细胞膜片应用于皮肤、心脏、角膜、牙齿损伤修复已经取得了较为良好的效果^[26-29]。2011 年, 日本已经批准应用细胞膜片技术修复关节软骨缺损的临床研究^[30]。

实验成功构建了人羊膜间充质干细胞膜片, 但是获取的细胞膜片是否具有成骨分化潜能, 对于组织工程骨的构建至关重要。该实验利用成骨诱导培养基培养人羊膜间充质干细胞膜片, 培养 14 d 后碱性磷酸酶活性明显增高; 茜素红染色结果显示细胞外基质中有橘红色的结节产生; 免疫组化结果显示细胞周围有大量 I 型胶原产生; RT-PCR

和Western blot结果显示I型胶原、骨钙蛋白以及Runt相关转录子2的mRNA水平及其蛋白表达明显增高,差异有显著性意义($P < 0.05$),表明诱导的人羊膜间充质干细胞膜片具有良好的成骨分化潜能。

综上所述,该研究应用一种简便、经济的方法成功构建了人羊膜间充质干细胞膜片,且该膜片具有良好的成骨分化潜能。该研究侧重于观察人羊膜间充质干细胞膜片成骨诱导的体外实验效果,未来还需在体内实验中观察人羊膜间充质干细胞膜片对于骨缺损的修复效果。

致谢: 感谢遵义医科大学免疫学实验室的支持与帮助。

作者贡献: 实验设计为邹刚、尤奇、刘毅,实验实施为邹刚、尤奇、沈梦杰,实验评估为刘毅,治疗收集为尤奇、张骏、汤井洋、金瑛。

经费支持: 该文章接受了“贵州省科技厅联合基金(黔科合LH字【2017】7015号)”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: 所有程序及实验操作均得到遵义医科大学附属医院伦理委员会批准(审批号ZY.442016590307)且符合要求。

知情同意问题: 实验所用标本来自于遵义医科大学附属医院产科足月产产妇,术前均签署知情同意书,符合遵义医科大学附属医院伦理委员会要求。

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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过遵义医科大学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] 杜辉,付勤.同种异体骨移植与自体骨移植修复四肢粉碎性骨折:骨性愈合及骨活性比较[J].中国组织工程研究,2015,19(8):1206-1210.
- [2] HERNIGOU P. Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries (Duhamel, Haller, Ollier and MacEwen). *Int Orthop*. 2015;39(1):193-204.
- [3] NIWA H, MASUI S, CHAMBERS I, et al. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22(5):1526-1536.
- [4] DING C, ZOU Q, WANG F, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):55.
- [5] LV X, GUO Q, HAN F, et al. Electrospun Poly(L-lactide)/Poly(ethylene glycol) Scaffolds Seeded with Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells for Urethral Epithelium Repair. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8). pii: E1262.
- [6] LI Y, LIU Z, JIN Y, et al. Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells into Human Anterior Cruciate Ligament Fibroblast Cells by In Vitro Coculture. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7360354.
- [7] PAROLINI O, CARUSO M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S186-195.
- [8] 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):2798-2808.
- [9] WU PH, CHUNG HY, WANG JH, et al. Amniotic membrane and adipose-derived stem cell co-culture system enhances bone regeneration in a rat periodontal defect model. *J Formos Med Assoc*. 2016;115(3):186-194.
- [10] MIKI T. A Rational Strategy for the Use of Amniotic Epithelial Stem Cell Therapy for Liver Diseases. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(4):405-409.
- [11] SHU J, HE X, LI H, et al. The Beneficial Effect of Human Amnion Mesenchymal Cells in Inhibition of Inflammation and Induction of Neuronal Repair in EAE Mice. *J Immunol Res*. 2018;2018:5083797.
- [12] LIU Y, CAO DL, GUO LB, et al. Amniotic stem cell transplantation therapy for type 1 diabetes: a case report. *J Int Med Res*. 2013;41(4):1370-1377.
- [13] COHEN J, ZALESKI KL, NOURISSAT G, et al. Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96(1):93-99.
- [14] SHI D, XU X, YE Y, et al. Photo-Cross-Linked Scaffold with Kartogenin-Encapsulated Nanoparticles for Cartilage Regeneration. *ACS Nano*. 2016;10(1):1292-1299.
- [15] SETO Y, INABA R, OKUYAMA T, et al. Engineering of capillary-like structures in tissue constructs by electrochemical detachment of cells. *Biomaterials*. 2010;31(8):2209-2215.
- [16] TANG CS, SCHMUTZ P, PETRONIS S, et al. Locally Addressable Electrochemical Patterning Technique (LAEPT) applied to poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) adlayers on titanium and silicon oxide surfaces. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(3):285-295.
- [17] ISHII M, SHIBATA R, NUMAGUCHI Y, et al. Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2210-2215.
- [18] HONG Y, YU M, WENG W, et al. Light-induced cell detachment for cell sheet technology. *Biomaterials*. 2013;34(1):11-18.
- [19] BYAMBAA B, KONNO T, ISHIIHARA K. Detachment of cells adhered on the photoreactive phospholipid polymer surface by photoirradiation and their functionality. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;103:489-495.
- [20] GUILLAUME-GENTIL O, SEMENOV OV, ZISCH AH, et al. pH-controlled recovery of placenta-derived mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials*. 2011;32(19):4376-4384.
- [21] CHEN YH, CHUNG YC, WANG IJ, et al. Control of cell attachment on pH-responsive chitosan surface by precise adjustment of medium pH. *Biomaterials*. 2012;33(5):1336-1342.
- [22] TAKAGI R, YAMATO M, KANAI N, et al. Cell sheet technology for regeneration of esophageal mucosa. *World J Gastroenterol*. 2012;18(37):5145-5150.
- [23] LORIES RJ, DERESE I, LUYTEN FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1571-1579.
- [24] YING J, WANG P, ZHANG S, et al. Transforming growth factor-beta1 promotes articular cartilage repair through canonical Smad and Hippo pathways in bone mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2018;192:84-90.
- [25] BEACHY PA, KARHADKAR SS, BERMAN DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*. 2004;432(7015):324-331.
- [26] MATSUURA K, SHIMIZU T, OKANO T. Toward the development of bioengineered human three-dimensional vascularized cardiac tissue using cell sheet technology. *Int Heart J*. 2014;55(1):1-7.
- [27] KOBAYASHI T, KAN K, NISHIDA K, et al. Corneal regeneration by transplantation of corneal epithelial cell sheets fabricated with automated cell culture system in rabbit model. *Biomaterials*. 2013;34(36):9010-9017.
- [28] ZHAO YH, ZHANG M, LIU NX, et al. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials*. 2013;34(22):5506-5520.
- [29] LIN YC, GRAHOVAC T, OH SJ, et al. Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model. *Acta Biomater*. 2013;9(2):5243-5250.
- [30] SATO M, YAMATO M, HAMAHASHI K, et al. Articular cartilage regeneration using cell sheet technology. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(1):36-43.