

大鼠羊膜细胞体外培养及其干细胞标记物的表达

曲春辉, 张 玲, 武 杰, 巨荣凯, 朱 华, 黄 澜, 徐艳峰, 白 琳, 秦 川

(北京协和医学院 中国医学科学院医学实验动物研究所病理室, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 分离并鉴定大鼠羊膜细胞, 探索羊膜细胞分化潜能, 为干细胞移植治疗探寻新的细胞来源。**方法** 机械分离羊膜组织并采用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 应用高糖-DMEM 培养基(添加 10 $\mu\text{g/L}$ 人表皮生长因子)培养, 采用流式细胞术检测间充质干细胞表面标志物, 通过细胞免疫荧光染色检测神经干细胞表面标记物。**结果** 大鼠羊膜组织可分离并培养, 细胞呈梭型, 贴壁生长, 短期内可以稳定增殖。细胞表达干细胞表面标记物八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor, Oct-4) 和性别决定区 Y 框蛋白(sex determining region Y box 2, Sox-2), 间充质干细胞表面标志物 vimentin, 胚胎干细胞标记物阶段特异性胚胎表面标记物(stage specific embryonic antigen-4, SSEA-4), 并表达神经干细胞表面标志物 nestin, 可表达脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) 和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)。**结论** 大鼠羊膜细胞可表达间充质干细胞和神经干细胞标记物, 并有神经营养因子表达, 为大鼠羊膜细胞的研究和应用提供实验依据。

【关键词】 羊膜细胞; 体外培养; 间充质干细胞标志物; 神经干细胞标志物; 神经生长因子; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 04-0061-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.012

Isolation, culture and identification of rat amniotic cells in vitro and their expression of stem cell markers

QU Chun-hui, ZHANG Ling, WU Jie, JU Rong-kai, ZHU Hua,

HUANG Lan, XU Yang-feng, BAI Lin, QIN Chuan

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To isolate and identify the rat amniotic cells and to explore their stem cell characteristics, so as to find a new cell source for stem cell transplantation. **Methods** Rat amnion tissue was mechanically separated from 18-18.5-day old SPF pregnant rats and 0.25% trypsin-EDTA digestion was used to obtain amniotic cells. The isolated cells were cultured with DMEM D-glucose added with 10 $\mu\text{g/L}$ EGF. Flow cytometry was used to detect the mesenchyme stem cells surface markers. Neural stem cell surface markers of the rat amniotic cells were detected using immunofluorescence staining. **Results** The rat amniotic membrane tissue was separated and mesenchymal stem cells were cultured successfully. The cells were ameboid-shaped and showed adherent growth, and can stably proliferate in short term. After

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题实施方案 SS2012AA022613。

[作者简介] 曲春辉, 女, 硕士研究生, E-mail: quchunhui626@163.com。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

culture, the cells expressed stem cell markers e. g. Oct-4 and Sox-2, mesenchymal stem cell markers e. g. vimentin, embryonic stem cell markers e. g. SSEA-4, neural stem cell marker e. g. nestin, and could also express neurotrophic factors, such as BDNF and NGF. **Conclusions** Rat amniotic cells express mesenchymal stem cells markers, neural stem cell markers and neurotrophic factors, therefore, provide an experiment basis for further research and application of rat amniotic cells in stem cell transplantation.

【Key words】 Amniotic cells; Culture in vitro; Mesenchymal stem cells, marker; Neural stem cell, marker; Neurotrophic factor; Rat

羊膜位于胎盘绒毛膜内侧,是一层无血管、神经、淋巴和肌肉的透明薄膜,可起到对胎儿的保护作用,与发育中的胎儿联系紧密。人源羊膜细胞在受精后第 8 天开始形成,具有多项分化的潜能,可向三个胚层细胞进行分化,近年来研究表明,羊膜上皮细胞能够分化为成熟的神经细胞,并合成释放多巴胺、乙酰胆碱、去甲肾上腺素等神经递质^[1]。人羊膜细胞具有低免疫原性和有效的免疫抑制力,细胞移植后不会发生急性排斥反应^[2]。本实验从大鼠羊膜分离获取羊膜细胞,建立稳定培养的条件,并对其生物学特性进行了探讨,为其将来在细胞移植治疗方面的应用提供实验依据。

1 材料和方法:

1.1 材料

1.1.1 主要仪器:CO₂ 培养箱、净化工作台、倒置显微镜、倒置荧光显微镜、共聚焦荧光显微镜、流式细胞仪。

1.1.2 主要试剂:DMEM 高糖培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、人表皮生长因子(EGF)、0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶(0.25% trypsin-EDTA)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、抗生素(penicillin, streptomycin)、PBS 缓冲液购自于 Gibco 公司。Oct-4、Sox-2、SSEA-4、nestin、vimentin、BDNF、NGF、CD90 购自与 Abcam 公司。CD29、CD44 购自于 eBioscience 公司、CD45、CD11b 购自于 BD 公司。

1.1.3 实验动物:SPF 级孕 18~18.5 d 的 SD 大鼠,购自中国军科院实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)2014-0004,实验动物使用批准号:ILAS-PL-2014-001。在无菌条件下进行实验操作分离羊膜组织。

1.2 方法

1.2.1 羊膜细胞分离及培养:SD 孕鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g),麻醉后,无菌条件下开腹,机械性分离子宫层,剥离胎盘,分离羊膜组织置于含有 500 U/mL 双抗的 PBS 溶液中冲洗。将羊膜

组织放置在含有 500 U/mL 双抗的 DMEM 基础培养基中,无菌眼科剪将其剪至 1 mm³ 左右的小块。将组织悬液移至 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶 10 mL,37℃,5% CO₂ 条件下消化 20~30 min。用含有 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化。200 目不锈钢滤网过滤单细胞悬液,接种至 25 cm² 培养瓶,含 10% FBS、10 μg/LEGF 和 500 U/mL 双抗的 DMEM 完全培养基培养,隔天细胞换液,2~3 d 后细胞长满培养瓶 85%~90% 时,进行细胞传代。

1.2.2 流式细胞术检测:取培养 2~4 代细胞,用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化,含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化。细胞计数将其稀释成 1 × 10⁶ 个,每个流式管 1 mL 细胞悬液。每流式管加 2 mL PBS 使细胞混匀,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。重复加 2 mL PBS 重悬细胞,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。每管加 50 μL PBS 重悬细胞,加抗体 CD29-PE-Cy7、CD44-PE、CD90-FITC、CD45-PE-CY7、CD11b-APC,避光室温孵育 30 min。每管加 2 mL PBS 重悬细胞 2000 r/min 离心 5 min,弃上清液。各管加 300 μL PBS 重悬细胞上机检测。

1.2.3 免疫荧光细胞染色:取 2~4 代细胞,0.25% 含 EDTA 胰蛋白酶消化,含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化。加入完全培养基重悬,至 24 孔板中培养。待细胞增殖至 70% 作用时,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛(预冷)固定 10 min。PBS 冲洗 2 次,每次 5 min。1% Triton-100 × 孵育 10 min。PBS 冲洗 2 次,每次 5 min。山羊血清工作液每孔 100 μL 室温下封闭 30 min。吸去山羊血清工作液,抗体稀释液稀释抗体 Oct-4 (1:200)、Sox-2 (1:200)、SSEA-4 (1:200)、nestin (1:100)、vimentin (1:100),每孔 100 μL,4℃ 过夜孵育。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。避光条件下,PBS 稀释 FITC 标记的羊抗鼠二抗 (1:200),37℃ 避光孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAPI 封片剂封片。共聚焦荧光显微镜观察。

1.3 统计学方法

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 15.0 统计软件进行统计处理,对其进行单因素方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 分离细胞培养

分离培养大鼠羊膜细胞,镜下,细胞呈变形虫样生长(图 1a),生长速度快(图 1b),需隔天换液传代。本实验中大鼠羊膜细胞可传至 6~7 代。

2.2 流式细胞术鉴定细胞表面抗原结果

经流式细胞术鉴定大鼠羊膜细胞间充质细胞表面标记物 CD29、CD44 分别为 97.6% 和 95.8%。细胞表面抗原 CD90、CD45 几乎不表达,CD11b 有少量表达(图 2 见文后彩插 6)。

2.3 细胞免疫荧光鉴定细胞表面标记物结果

本实验通过细胞免疫荧光方法检测大鼠羊膜细胞表达干细胞标记物 Oct-4 和 Sox-2(如图 3),神经干细胞标记物 nestin 和间充质干细胞标记物 vimentin(如图 4),(图 3~4 见文后彩插 7)并表达胚胎干细胞标记物 SSEA-4(如图 5)。可表达神经营养因子 BDNF 和 NGF(如图 6)(图 5~6 见文后彩插 8)。

3 讨论

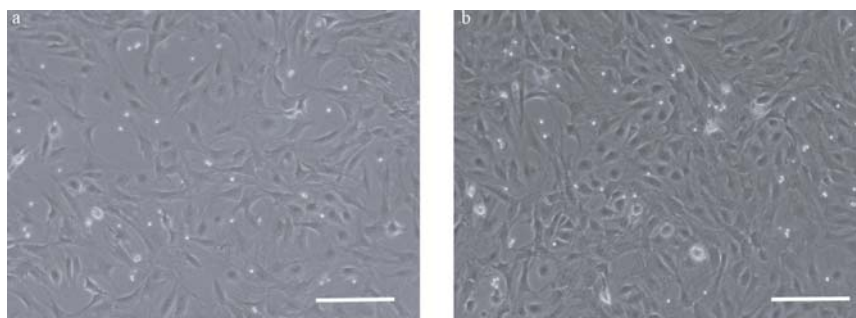
通过细胞免疫荧光实验发现大鼠羊膜细胞表达干细胞表面标记物 Oct-4 和 Sox-2,间充质细胞标记物 vimentin 和神经细胞标记物 nestin,表达 SSEA-4。可表达神经营养因子标记物 BDNF 和 NGF,这些神经营养因子是神经元生长与存活所必需的蛋白质分子^[3]。羊膜细胞表达间充质干细胞标记物 CD29

和 CD44,其表达量均在 95% 以上,CD45、CD90 几乎不表达,CD11-b 有少量表达。

Oct-4 可参与胚胎干细胞的自我更新^[4,5],调节胚胎干细胞的多分化潜能^[6]。有研究指出 Oct-4 在羊膜细胞核内及细胞质均可表达^[7]。Miki 等人研究结果表明人羊膜上皮细胞和间充质细胞都可表达 Sox-2、Oct-4 等干细胞标志物^[1]。本实验结果显示在大鼠羊膜细胞中 Oct-4 在胞核和胞质中均有表达。

Nestin 被认为是在胚胎和成体组织中的多能性神经干细胞的标记物^[8-10]。在有丝分裂活跃的中枢神经系统和周围神经系统细胞中表达,现作为神经干细胞的标记物被广泛应用^[11]。人羊膜来源的间充质干细胞经体外诱导分化,可分化为神经样细胞并表达 nestin、Oct-4 和 Sox-2^[12]。Vimentin 起到维持细胞形态,胞质完整性和稳定细胞骨架的作用。有研究发现在妊娠 15 d 的大鼠胚胎中检测有 nestin 和 vimentin 的表达,人羊膜细胞未分化的前体细胞中也存在 nestin、vimentin 表达^[13,14]。有研究发现大鼠羊膜细胞和人羊膜细胞中都表达 nestin 和 vimentin 因子^[15-19]。SSEA-4 被认为是特异性人胚胎干细胞和卵泡期胚胎早期卵裂的标记物,也被视为成体间充质干细胞的标记物^[20]。Ilancheran 等与他的同事 MIKI 等分别通过实验证明了人羊膜上皮细胞表达胚胎干细胞表面标记物 SSEA-4^[1,21]。本实验通过细胞免疫荧光方法检测出大鼠羊膜细胞表达 nestin、vimentin 和 SSEA-4。

NGF 和 BDNF 都是神经营养因子家族中成员。NGF 同时也是一种信号分子^[22],缺乏 NGF 对神经元的营养作用,神经元会出现凋亡^[23]。BDNF 可促进神经元的存活并能支持神经元和突触的生长和



注:(a)培养大鼠羊膜细胞第 2 天,(b)培养大鼠羊膜细胞第 3 天

图 1 分离并培养大鼠羊膜细胞,细胞呈变形虫样生长(标尺 = 100 μm)。

Note. (a) Rat amniotic cells cultured for 2 days, (b) Rat amniotic cells cultured for 3 days.

Fig. 1 Ameboid-shaped rat amniotic cells can be seen at 2 days (a) and 3 days (b) after isolation and culture. (Scale bar = 100 μm)

分化^[3]。BDNF 可减少突触丧失、矫正部分异常基因表达、阻止神经元萎缩且改善与年龄相关的认知障碍,提高学习记忆能力^[24, 25]。研究人员发现人羊膜上皮细胞和人羊膜间充质细胞可合成释放神经营养因子 BDNF、NGF 和 NT-3,其他的神经营养因子通过细胞培养后检测没有表达^[2, 12, 26, 27]。多个实验证实通过移植人羊膜细胞到损伤部位能修复受损伤的神经元, BDNF 的表达水平同时增加^[28-30],说明人羊膜细胞很可能通过释放 BDNF 来修复损伤神经元的功能。本实验中通过细胞免疫荧光方法也发现大鼠羊膜细胞表达神经营养因子 BDNF 和 NGF。

人羊膜间充质细胞可表达间充质细胞标记物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD166 和 CD105,不表达骨髓造血标记物 CD34 和 CD45、单核细胞标记物 CD114 和巨噬细胞标记物 CD11b^[1, 31, 32]。Murphy 等在研究人羊膜上皮细胞特点时发现,人羊膜上皮细胞表达上皮粘附分子 EpCAM,几乎不表达 CD90 和 CD105^[33]。而人羊膜间充质细胞表达 CD90、CD73 和 CD105,其表达量都在 95% 以上,CD45、CD34 表达量少于 2%^[34]。Bailo 等发现人羊膜细胞表达 CD105、CD73、CD90 和 CD29,不表达 CD34、CD45、CD14 和 CD3^[18]。本实验中通过流式细胞术方法检测到大鼠羊膜细胞表达 CD29 和 CD44,不表达 CD90、CD45,少量表达 CD11b。

羊膜细胞易于分离培养,细胞生长速度快,免疫原性低,并有向三个胚层分化的潜能,在相关疾病的治疗中具有很好的前景。本实验较为系统地检测了大鼠羊膜细胞的四类干细胞标记物,发现大鼠羊膜细胞可表达干细胞表面标记物 Oct-4 和 Sox-2、胚胎干细胞标记物 SSEA-4、间充质干细胞标记物 vimentin 和神经干细胞标记物 nestin,并同时还表达神经生长因子 BDNF 和 NGF。由此,我们推测大鼠羊膜细胞很可能具有某些间充质干细胞和神经干细胞的特性,为相关基础研究和神经系统疾病的治疗提供了一些线索。

参考文献:

- [1] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(10): 1549 - 1559.
- [2] Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2014, 67(5): 662 - 675.
- [3] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 677 - 736.
- [4] Takeda J, S Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(17): 4613 - 4620.
- [5] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 947 - 956.
- [6] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 271 - 278.
- [7] Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(3): 25.
- [8] Kim JS, Kim J, Kim Y, et al. Differential patterns of nestin and glial fibrillary acidic protein expression in mouse hippocampus during postnatal development [J]. *J Vet Sci*, 2011, 12(1): 1 - 6.
- [9] Messam CA, Hou J, Berman JW, et al. Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134(1-2): 87 - 92.
- [10] Wong A, Ghassemi E, Yellowley CE. Nestin expression in mesenchymal stromal cells: regulation by hypoxia and osteogenesis [J]. *BMC Vet Res*, 2014, 10(1): 173.
- [11] Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation [J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(2): 665 - 671.
- [12] Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, et al. Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(5): 1022 - 1033.
- [13] Shinya M, Komuro H, Saihara R, et al. Neural differentiation potential of rat amniotic epithelial cells [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2010, 29(3): 133 - 143.
- [14] Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, et al. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 209(1): 9 - 12.
- [15] Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, et al. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane [J]. *Differentiation*, 2008, 76(2): 130 - 144.
- [16] Marcus AJ, Coyne TM, Black IB, et al. Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1256 - 1264.
- [17] Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2): 447 - 458.
- [18] Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta [J]. *Transplantation*, 2004, 78(10): 1439 - 1448.

- [19] 陈宥艺, 陆琰, 王科, 等. 羊膜上皮细胞体外培养条件的优化及其干细胞标志的表达 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(2): 464–468.
- [20] Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. Blood, 2007, 109(4): 1743–1751.
- [21] Ilancheran S, Michalska A, Peh G, et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential [J]. Biol Reprod, 2007, 77(3): 577–588.
- [22] Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems [J]. Rev Neurosci, 2009, 20(2): 133–145.
- [23] Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, et al. NGF deprivation-induced gene expression; after ten years, where do we stand? [J] Prog Brain Res, 2004, 146: 111–126.
- [24] Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes [J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(4): 267–270.
- [25] Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 2009, 15(3): 331–337.
- [26] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(4): 585–590.
- [27] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, et al. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain; a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells [J]. Front Neurosci, 2013, 7: 194.
- [28] Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury [J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(24): 2101–2107.
- [29] Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells [J]. Neurosci Lett, 2003, 341(1): 1–4.
- [30] Xue SR, Chen CF, Dong WL, et al. Intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells ameliorates spatial memory deficit in the doubly transgenic mice coexpressing APP^{swe} and PS1^{DeltaE9}-deleted genes [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(17): 2642–2648.
- [31] Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine [J]. Differentiation, 2011, 81(3): 162–171.
- [32] 方宁, 宋秀军, 张路, 等. 人羊膜上皮细胞的分离培养及鉴定 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(2): 121–124.
- [33] Murphy S, Rosli S, Acharya R, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use [J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2010, Chapter 1: Unit 1E 6.
- [34] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta; outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. Stem Cells, 2008, 26(2): 300–311.

[修回日期]2015-02-02