

羊水干细胞研究进展与肝细胞移植治疗

郑玉宝 高志良

干细胞(stem cell)是具有自我更新和向多种细胞分化能力的细胞,是目前医学、生物学及组织工程研究的热点之一。《Science》杂志 1999 年 10 大科学成果的第 1 位就是干细胞,2000 年再度入选世界 10 大科学成果,2004 年首次利用克隆技术获得人类胚胎干细胞。1961 年 Till 等^[1]首次证实骨髓细胞中含有造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)。干细胞在细胞移植治疗及组织工程与再生医学等领域的研究应用呈现着日新月异地发展。干细胞主要类型包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs),后者包括骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MMSCs)^[2]、脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)^[3]、人脐血干细胞(human umbilical cord blood stromal cells, HUCBSCs)^[4]等。由于 ESCs 的伦理限制和 ASC 来源数量不足及细胞增殖分化能力有限等缺陷限制了干细胞的进一步研究和应用。国内外学者在不断地寻找其他来源的干细胞。2007 年美国科学家发现羊水中存在一类具有胚胎干细胞增殖分化特性的细胞,并将其命名为羊水干细胞(amniotic fluid stem cells, AFSCs)^[5]。

一、AFSCs 的发现和来源

1978 年 Priest 等^[6,7]发现胚胎发育羊水里包含多种类型羊水细胞(adult stem cells, AFCs),来源主要有胎儿及附属组织,包括胎儿皮肤、胎盘的羊膜、胎儿消化道、呼吸道、泌尿生殖道的黏膜及上皮细胞^[7]。2003 年有学者发现孕中期羊水中含有 Oct-4 阳性表达的细胞,提示羊水中蕴涵丰富的多能干细胞并且可以避免 ESC 研究的伦理约束^[8,9]。随后的几年里对羊水干细胞的研究热潮一直未断,台湾学者 Tsai 等^[10,11]通过两步培养法成功地从孕中期羊水中通过贴壁培养分离出具有多潜能间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),具有神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的特性,在特定的诱导条件下可分化成脂肪细胞、成骨细胞及神经细胞;国内学者李现铎等^[12]分离出 MSCs 并诱导成平滑肌和脂肪细胞。DeCoppi 等^[5]通过免疫磁选(Mini-MACS)成功从孕中期(16~22 W)分离出 c-Kit(CD117)阳性的 AFCs,增殖快、分化能强、传代表型稳定、来源分离容易等优点,并将其命名为羊水干细胞即 AFSCs。AFSCs 具体的来源目前不清楚,Godsen 等^[27]研究发现 AFC 在胚胎发育中来源是多样的,有研究显示 c-Kit⁺ AFCs 主要定位在胎盘中早期造血细胞发生部位^[19],故不能排除胚胎早期胎盘膜中含有 c-Kit⁺ 细胞,正在进行的实验表明 AFSCs 的确拥有造血潜能^[17];DeCoppi 等实验显

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院感染科

通讯作者:高志良 Email:gaozl@21cn.com

示 Y 染色体持续存在男性胎儿发育羊水细胞中,说明 AFSCs 来源于发育中的胎体及附属物。该类细胞的发现在国内外引起了广泛的影响。

二、AFSCs 的分离与培养

羊水中含有的细胞主要有 3 类:上皮细胞、成纤维细胞、羊水细胞等^[20],而 c-Kit⁺ AFCs 仅占羊水中细胞总数的 1% 左右^[5]; AFSCs 分选主要有 3 种方法:免疫微珠磁选法、贴壁分离法、流式细胞仪分选等^[12,17]。(1) 比较常用的是 Mini-MACS 法,该方法具有分离细胞纯度高,但成本较高;(2) 直接贴壁分离法操作简单,费用少,但分选出细胞纯度低,用贴壁法分选出的干细胞主要是 MSCs;(3) 通过流式细胞仪分选对细胞活性影响较大、费用不低;分选方法选择的不同,直接影响到分选出的细胞种群,进而影响到分选后细胞的生物特性。Mini-MACS 是通过从孕中期产前诊断标本中阳性选择出 CD117⁺ 的 AFCs,CD117 是干细胞因子(stem cell factor, SCF)的受体;实验表明^[5] Mini-MACS 分选出 c-Kit⁺ AFCs 扩增培养稳定,分化活性高,分选出细胞可以大量扩增能够满足于临床需要。

三、AFSCs 的生物学特性

1. 细胞形态:AFSCs 细胞群呈不均一性,形态多样可呈梭形、多角形、圆形、椭圆形等^[13];同源的 AFSCs 具有正常的细胞核型和保持较长的端粒酶具有较强增殖活性;Giemsa band 核型图显示前几代 AFSCs 染色体长度约 >250 p. d;早期的几代 AFSCs 端粒酶约 20 p. d^[5]。

2. 细胞周期:流式细胞仪检测显示细胞 DNA 合成的 S 期在扩增许多代后的细胞中所占比例仍较高,甚至扩增 250 倍增数后,细胞表现稳定的核型,双倍体的 DNA 含量处于 G1 期,大多数 AFSCs 处于 G0/G1 期说明细胞增殖能力较强^[5];而国内学者通过贴壁机械选取的羊水来源的 MSCs,扩增到第 3、5 代时大多数细胞处于 S 期,而扩增第 10 代后细胞增殖能力就有所下降,分析可能是由于选取分离方法不一样,所分选的细胞种群不同所致^[12]。

3. 表型特征:AFSCs 是通过免疫磁选从羊水分离出 c-Kit 阳性表达的细胞,研究发现 AFSCs 可同时表达 ESCs 和 ASCs 表面标志,推测 AFSCs 可能处于 ESCs 与 ASCs 中间的过渡状态^[5];流式细胞仪检测显示 AFSCs 表面主要表达以下几类标志:(1) ESCs 表面标志:阳性表达 SSEA-4^[5],阳性表达维持 ES 及胚胎体细胞(EG)未分化状态的转录因子 Oct-4^[14],弱阳性表达 Tra-1-60,阴性表达其他 ES 及 EG 细胞表面抗原 SSEA-3、ra-1-81 等^[15];(2) 同时表达许多 ASC 表面标志:CD73、CD90、CD29、CD44、CD105、CD146、CD117 等^[10,12,16],阴性表达 HSC 表面标志 CD34、CD133、CD45 等分子;(3) 阳性表达 MHC I 分子(HLA-ABC),弱阳性表达 MHC II 分子(HLA-DR)^[5];阳性表达 B-7 共刺激分子 CD80 和 CD86 分子、CD68(巨噬细胞表面标志)及 CD146(血管生成素)等分子^[17]。分选 AFSCs 标志物 CD117 同时也表达在 ESC 及多种 ASC 表面上,在配子发育、黑素形成及造血过程中发挥重要作用^[28];这也提示 AFSCs 来源的多样性。

4. 增殖能力:AFSCs 体外扩增能力较强,平均倍增时间是 36 h,并且不需要滋

养层培养,扩增出的细胞系表型稳定,甚至扩增到 250 群体倍增数后仍能保持正常的核型和较长端粒酶;与 MMSCs 比较 AFSCs 体外扩增具有较强能力、稳定性较高^[22]。但是通过贴壁机械分离出 MSCs 体外增殖能力较弱,传到 P3、P5 具有较强倍增活性,至 P10 后观察细胞端粒酶长度较前变短,扩增能力减弱;分析可能由于方法不同分选出细胞亚群的差异有关^[12]。

5. 分化潜能:AFSCs 同时表达 ADSs 和 ESCs 表面标志物,兼有 ADSs 和 ESCs 增殖分化特征;根据 AFSCs 的表型及表达转录因子 Oct-4,可以说 AFSCs 是 ESCs 和 ASCs 中间的过渡阶段^[22,23],体内实验证实 AFSCs 是没有致瘤性的,但 ESCs 移植体内可以形成畸胎瘤^[23,24]。De Coppi 等^[5]实验表明 AFSCs 具有广泛多潜能分化特性,可以单独分化成多胚层组织:脂肪细胞、神经细胞、成骨细胞、内皮细胞、肝细胞、肌细胞等组织细胞,并通过功能鉴定;将 AFSCs(包括最后一代细胞)移植给严重免疫缺陷(SCID)/拜格小鼠(Beige mice, CB17/lcr. Cg-PrkdcscidLyst-bg/Crl)均没发现有肿瘤形成;细胞周期检测显示 G1/G2 细胞周期检查点是完整的,进一步证实 AFSCs 分化的稳定性。研究表明 AFSCs 分化发生在不同种系的祖细胞中,排除了是由单个克隆细胞系分化的可能性。韩国科学家 Kim 等^[26]研究发现来源羊水的 MSCs 可成功分化成脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞等,并进行了功能的鉴定;也进一步验证了 AFSCs 分化特性。但 AFSCs 在胚胎个体发育中的作用仍然不清楚。

四、免疫学特性

实验表明 AFSCs 表面表达胚胎抗原 SSEA-4、转录因子 Oct-4、胚胎多能性维持因子 Nanog,同时表达 CD80、CD86、CD68 及 MHC I 分子(HLA-ABC)等,故 AFSCs 因内在的免疫刺激因素的存在,在异体移植中可能很难逃避免疫反应的排斥。国外学者 Chiavegato 等^[17]用人的 AFSCs 移植给免疫抑制和免疫缺陷小鼠心肌的实验中发现 AFSCs 遭到免疫反应的排斥,进一步研究发现 AFSCs 表面持续表达 CD68、CD80、CD86 分子,以上分子对 T 淋巴细胞活化很重要,可以说 AFSCs 充当了抗原提呈细胞(APC)的作用。研究还发现 AFSCs 即 c-Kit⁺的 AFCs 如种植在特定培养基和细菌培养皿里 AFSCs 会发生细胞表型的转化,表面 CD68、CD80、CD86 分子的表达也会相应的上调^[18];也就是说 AFSCs 在不同的培养条件、移植到不同器官及不同周围微环境中表达免疫原性是不同的。因此,在将来的研究中应进一步探明免疫炎症反应及微环境在 AFSCs 移植免疫排斥反应中的作用。

五、肝细胞移植治疗中作用

目前对于各种终末期肝病,原位肝移植(OLT)是目前最有效的治疗方法,故近来肝移植成为治疗严重肝病的常规手段;但存在供肝来源匮乏、免疫排斥、无法有效控制反复感染及重叠感染等并发症的各种严重缺陷,限制了其临床应用。与 OLT 对应的肝细胞移植(HCT)相应的发展起来,肝细胞移植是将正常成年肝细胞、不同发育阶段肝细胞、肝潜能细胞、修饰型肝细胞及相关生长刺激因子,通

过不同途径移植到受体适当的靶位,使之定居、增殖,以至重建肝组织结构,并发挥主要正常肝功能的肝组织工程手段。HCT 成为一种治疗急、慢性肝功能衰竭和肝脏相关遗传代谢疾病的有效治疗方法^[29];HCT 理想的细胞来源应具有以下特点:具备向肝细胞分化的多能性或专能性;来源广泛;免疫反应低或无;增殖和自身修复能力强。近年来 ASCs 和 ESCs 及自体肝干细胞研究发展已在体内和体外成功分化为肝细胞,为 HCT 治疗提供一定细胞来源;但是一方面自体肝和胎肝供体有限,另一方面存在伦理学问题和成体干细胞体外扩增数量不足及分化能力有限等缺陷,目前国内外主要进行的是对肝病患者自体 MMSCs 的移植治疗并取得阶段性疗效,我科于 2005 年 9 月 28 日开始进行自体干细胞移植治疗项目,至 2006 年 2 月 28 日共治疗晚期肝病患者共 20 例,也取得了初步疗效。但是自体 MMSC 肝病的治疗毕竟是有创操作,对病人身体造成一定损伤;而且 MMSCs 分离培养尚需要一定时间和过程,不能及时地应用于突发肝病患者的治疗;同样由于随着患者年龄增长分离培养得到的 MMSC 数量有限,而且同时 MMSCs 受后天的长时间暴露于杀虫剂、农药、重金属、防腐剂、易挥发的有机化合物^[32]等微环境中,MMSC 向肝细胞分化能力也是有限的,分化的肝细胞功能尚不能完全代替正常肝细胞功能;近来肝细胞来源不足也成为其主要的缺陷,成为 HCT 发展的瓶颈,从某种程度上限制了 HCT 治疗^[30]。De Coppi 等^[5]对 AFSCs 在一定条件下诱导分化为肝细胞,鉴定发现诱导的肝细胞除表达白蛋白以外还可以分泌尿素,表明分化的肝细胞已具有了部分正常肝细胞的功能,AFSCs 将在 MSCs 之后成为另一更好的肝细胞种子来源。

六、前景与问题

AFSCs 具有广泛来源、增殖能力强、广泛分化潜能、分化稳定等优点。必将在肝细胞移植治疗及其他组织工程和再生医学中有着广泛的应用前景。目前也存在一些问题:异体干细胞移植免疫排斥反应问题、体外分化的肝细胞在体内功能尚未验证、肝脏其他功能仍没鉴定以及分化机制有待进一步的研究。但我们相信在不久的将来 AFSCs 一定会在各种终末期肝病的治疗上有着重大的突破,同时也会推动其他组织工程和再生医学进入一个新的发展阶段。

参 考 文 献

- 1 Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 1961, 14:213-22.
- 2 Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 2002, 174:11-20.
- 3 Kang SK, Lee DH, Bae YC, et al. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stroma cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*, 2003, 183:355-366.
- 4 Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 2003, 21:105-110.
- 5 De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007, 25:100-106.
- 6 Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH. Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. *Lab Invest*, 1978, 39:106-109.
- 7 Polgar K, Adany R, Abel G, et al. Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and

- phagocytosis assays. *Am J Hum Genet*,1989,45:786-792.
- 8 In t Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*,2003,102:1548-1549.
 - 9 AR, Marton E, Rosner M, et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*,2003,18:1489-1493.
 - 10 Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 2004,19:1450-1456.
 - 11 Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, et al. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod*,2006,74:545-551.
 - 12 李现铎,耿红全,朱哲,等. 孕中期羊水来源胎儿间充质干细胞的分离与培养及其生物学特性研究. *中华医学杂志*,2006,86:481-483.
 - 13 Kim J, Lee Y, Kim H, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*, 2007,40:75-90.
 - 14 Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*,2002,12:321-329.
 - 15 Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95:13726-13731.
 - 16 Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,289:519-524.
 - 17 Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *J Mol Cell Cardiol*,2007,42:746-759.
 - 18 Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *J Mol Cell Cardiol*,2007,42:746-759.
 - 19 Challier JC, Galtier MG, Cortez A, et al. Immunocytochemical evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta*,2005,26:282-288.
 - 20 潘小英,吴菁,傅文婷,等. 羊水细胞原位培养染色体制备技术在产前诊断上的应用. *中国优生与遗传杂志*,2006,14:43-45.
 - 21 Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-Kit tyrosine kinase receptor. *Cell*,1990,63:213-224.
 - 22 Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol int*,2006,30:681-687.
 - 23 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*,1998,282:1145-1147.
 - 24 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,1981,78:7634-7638.
 - 25 Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*, 2004,350:1353-1356.
 - 26 Kim J, Lee Y, Kim H, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*, 2007,40:75-90.
 - 27 Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull*,1983,39:348-354.
 - 28 Fleischman RA. From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends Genet*,1993,9:285-290.
 - 29 Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, et al. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst*, 1982,68:771-778.
 - 30 Atala A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Opin Pediatr*,2006,18:167-171.
 - 31 Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull*,1983,39:348-354.
 - 32 Ghen MJ, Roshan R, Roshan RO, et al. Potential clinical applications using stem cells derived from human umbilical cord blood. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006,13:562-572.

(收稿日期:2006-12-12)

(本文编辑:王宇)