

热点评析

人羊膜上皮细胞具有胚胎干细胞和移植免疫耐受等优良特性

郭礼和

干细胞具有自身复制和多向分化的潜能,在体内能够维持组织器官形态和生理功能的稳态,并具有修复外伤和病理引起的损伤的作用。故而,近年来在细胞生物学以及再生医学研究领域倍受重视。可以预见,干细胞在细胞治疗、组织工程、器官修复等方面的临床应用,将有广泛的前景和市场潜力;同时在遗传、发育、分化、调亡等生物学问题研究以及新药开发、药效学和毒性评估等方面,也有着广泛的科学探索和实际应用价值。干细胞研究必将成为生命科学研究的主战场和生物经济最为活跃的领域,也会对人类社会和人类健康产生重大影响。

干细胞来源可分为两大类:天然型和人工型。天然型是指生物体本身存在的多能的(pluripotent)或专能的(multipotent)干细胞(例如,胚胎干细胞和成体干细胞);人工型是指用人工方法将终末分化细胞改造成具有干细胞特性的细胞(例如,诱导性多能干细胞或转导性细胞)。目前,能用于临床治疗的主要是天然型的干细胞。

干细胞用于临床治疗要满足以下几个基本条件:1)不会致癌(包括良性瘤、肉瘤和癌);2)不会引起炎症、过敏和免疫反应;3)移植配型要求低;4)分化能力要强(移植的细胞分化后在形态结构和生理机能方面要能基本取代损伤的细胞,也就是分化要彻底);5)干细胞制备工艺简单,能够拿到足够数量的细胞,满足临床治疗的要求;6)每批生产出的细胞制剂要稳定,质量完全可控。

自体干细胞治疗,有许多优点,但不能形成产业化,因细胞来源个体差异大,在质量上难于控制。异体干细胞虽然能够产业化,但也很难完全满足上述所有要求。例如,胚胎干细胞具有三个胚层分化能力,但它的致癌性和配型却使人感到担忧。成体干细胞虽然在移植安全上较胚胎干细胞要好,但在

分化能力方面要考虑适应症是否用的得体。例如,用自身骨髓或异体来源的间充质干细胞治疗神经损伤,就要考虑它分化神经的能力是否彻底。间充质干细胞属于中胚层来源的干细胞,分化成骨骼、肌肉和脂肪较为合适,但要分化成属于外胚层范畴的神经组织,就有点勉为其难了。虽然,成体干细胞能够跨胚层分化,但一般分化不彻底,只能称为类似(-like)某某细胞。所以,人们主张成体干细胞应该恪守其责,用于自身所述胚层范畴内的临床治疗,除非有足够证据证明所使用的成体干细胞跨胚层分化能力很强,不然,临床上应用还须谨慎行事。

这里给大家介绍一种不为人们熟悉的具有胚胎干细胞特性的人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAEC),它来自人的羊膜,单层排列生长在面向羊水的一面,呈上皮样结构,每张人的羊膜约有1亿个这种细胞(图1)。

羊膜属于胎盘组织,和绒毛膜黏附在一起,但它不是与绒毛膜共同起源于胚外的、中胚层,而是由受精卵发育至第8天的囊胚内细胞团(inner cell mass)分化而来的,故而上皮细胞保有最早的胚胎干细胞特性。目前已知,羊膜上皮细胞除掉缺乏端粒酶表达之外,胚胎干细胞主要的分子标志物它基本都能表达,表明它具有胚胎干细胞所特有的向三个胚层组织分化的潜能(图2和图3)。

体外培养人羊膜上皮细胞会形成三种生长形态:在培养皿底部形成单层细胞,类似滋养层;在此层上面,还能像胚胎干细胞那样形成克隆球生长;另外,还有生长在培养液内的漂浮细胞。这三种形态的细胞(图2)都表达胚胎干细胞分子标志,但是强弱有别,克隆球的细胞表达最强,底部的滋养层表达最弱。在体外,人羊膜上皮细胞可以定向分化为内胚层来源的胰岛细胞和肝细胞,中胚层来源的骨骼

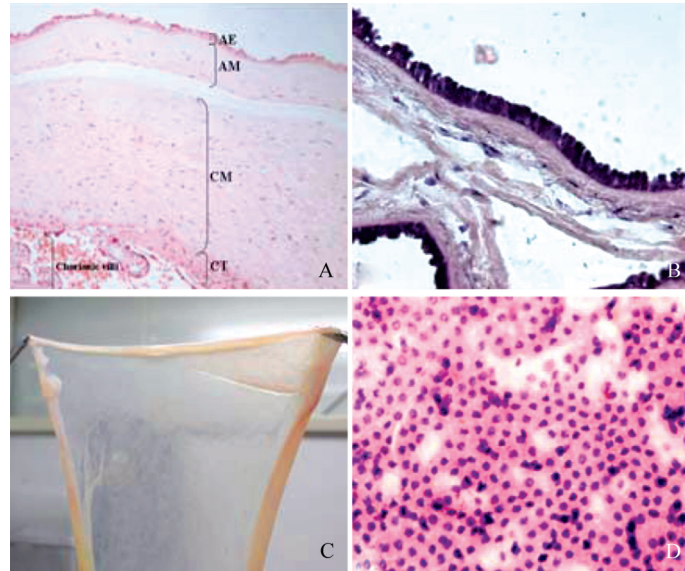


图1 人羊膜组织和上皮细胞

A: 胎盘和羊膜组织切片, AE为羊膜上皮细胞, AM为羊膜, CM为绒毛膜; B: 羊膜和羊膜上皮细胞组织切片, 深蓝色显示羊膜上皮细胞(柱状); C: 胎盘中剥离下来的羊膜; D: 羊膜上的上皮细胞形态。(图片来源: 本实验室)

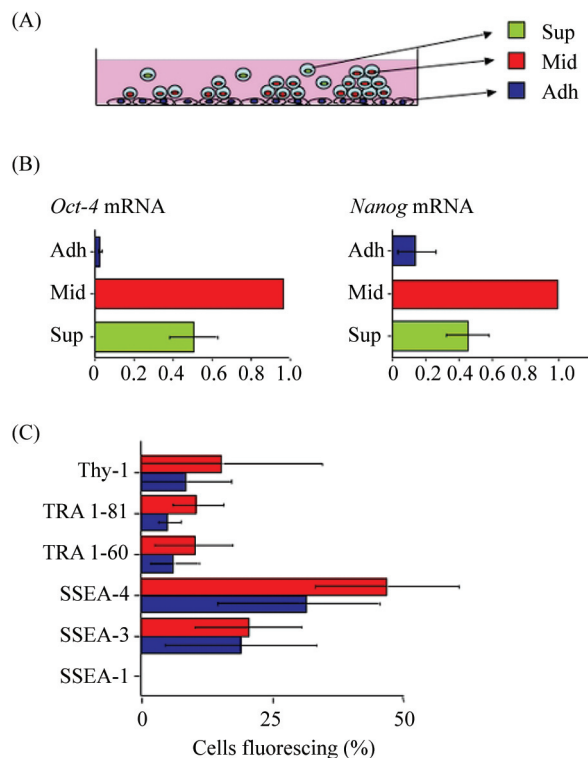


图2 羊膜上皮细胞体外培养三种形态及他们分别表达胚胎干细胞分子标志物的情况

A: Sup为培养的悬浮羊膜上皮细胞, Mid为形成克隆球的羊膜上皮细胞, Adh为黏附在底层的羊膜上皮细胞; B: 三胚层中Oct-4、Nanog的表达情况; C: 其它胚胎干细胞分子标志物在克隆球和底层细胞表达情况。SSEA-1是鼠胚胎干细胞的分子标志物, 在人胚胎干细胞内部不表达, 在人的羊膜上皮细胞也不表达。(图片来源: Stem Cell 2005; 23: 93-102.)

和肌肉, 外胚层来源的神经和皮肤组织(图3和图4)。在体内, 它由移植内环境决定分化为何种组织。

由于羊膜上皮细胞缺乏端粒酶, 故而在体外只

能培养4至5代, 培养十几天后细胞开始萎缩。虽然, 在体外羊膜上皮细胞不能大量扩增, 好在它的来源还是丰富的。因为, 每张人的羊膜剥离下来的细胞,

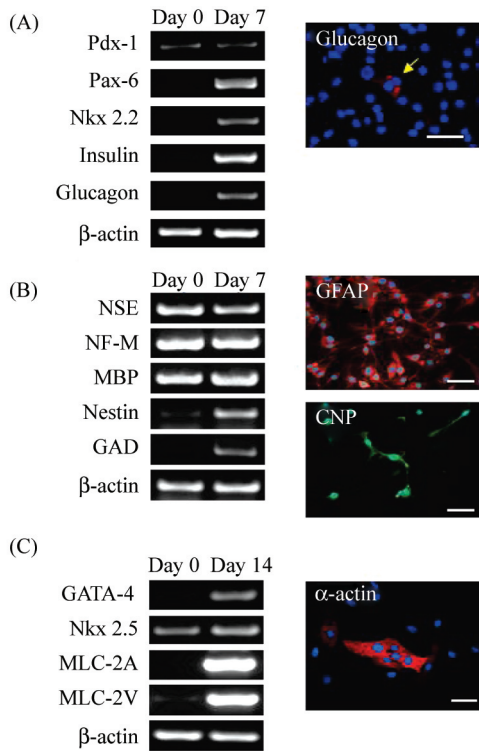


图3 显示人羊膜上皮细胞向三个胚层分化的潜能

A: 内胚层来源的胰岛分化, 体外诱导7天后, 胰岛的分子标志物能够表达, 组织化学显示高血糖素的合成; B: 外胚层来源的神经组织分子标志物的表达; C: 中胚层来源的心肌细胞分子标志物的表达。(图片来源: Stem Cell 2005; 23: 93-102.)

经体外培养后能拿到几亿个细胞, 临床上可满足约5个病人的治疗。人的羊膜是婴儿出生的废弃物, 来源方便, 只要征求产妇的同意, 应无伦理和法律的障碍。

人羊膜上皮细胞由于缺乏端粒酶, 虽然在体外扩增受到限制, 但也带来一个其他干细胞移植无法拥有的优点, 这就是移植后在宿主体内不能扩增, 因

而不会形成瘤, 当然也不会致癌。若将人羊膜上皮细胞移植到裸鼠皮下组织, 一年后也不会长出瘤, 说明移植是安全的。

人羊膜上皮细胞除了具有上述的干细胞优良特点之外, 它还具有移植免疫耐受特点。

根据遗传学理论, 胎儿对双亲来说属于异基因型(allogeneic), 基因组中一半来自父亲, 一半来自母亲。胎儿在母体内应属同种异体移植(allogeneic graft), 按理来说母体免疫系统要排斥胎儿。然而, 胎儿对母体却具有免疫耐受。这种耐受不是胎儿本身血缘所具有的, 因为借腹生子(没有血缘关系)的胎儿也是免疫耐受的。虽然, 这种免疫耐受机制很复杂, 但基本原理已很清楚。胎儿的羊膜和胎盘形成了免疫屏障, 抑制了母体免疫细胞的激活和对胎儿的入侵。

上世纪80年代初, 人们就已经知道人羊膜上皮细胞不表达HLA抗原(包括HLA-A、B、C、DR、 β 2微球蛋白等), 故而抗原提呈(antigen presentation)受阻, 它的移植不引发宿主免疫应答反应。体外免疫实验也能证明这种特征(表1)。用人羊膜上皮细胞与淋巴细胞在体外共培养, 可以明显抑制植物血凝素(PHA)和伴刀豆蛋白A(Con A)对淋巴细胞的激活。若用人羊膜上皮细胞分别与T、B淋巴细胞温育, 也能分别抑制Con A和LPS(脂多糖)对T、B淋巴细胞的激活。人羊膜上皮细胞在体外也能分别抑制MIP2(白细胞迁移激活蛋白2)对粒细胞和巨噬细胞的迁移作用(图5)。若是T、B淋巴细胞已经激活, 体外培养的羊膜上皮细胞也能促使它们凋亡(图6)。

羊膜上皮细胞能够分泌多种炎症抑制因子, 例如白细胞迁移抑制因子(MIF)、 $TGF\beta$ 、IL-10、防御素(Defensin)等, 故而具有很好的抗炎症功能, 有利

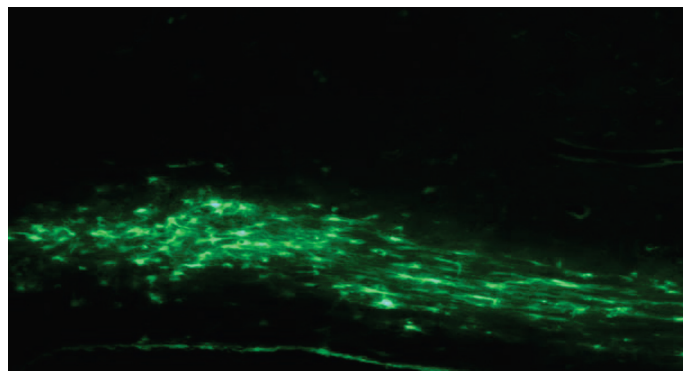


图4 人羊膜上皮细胞向神经组织分化

绿色荧光蛋白标记的人羊膜上皮细胞注射到大鼠侧脑室, 吸附在室管壁上, 然后迁往室管壁下并分化成神经组织。观察羊膜上皮细胞二个月后的分化和生存情况。图下方的绿色荧光线条表示留在室管壁上的羊膜上皮细胞。(图片来源: 本实验室)

表1 人羊膜上皮细胞对体外抗原刺激三位供血者淋巴细胞反应的影响

	组别	体积(ml)	转化率(%)	母细胞转化率(%)
实验组	羊膜细胞+Wu	0.5+0.5	4.8	4.4
	羊膜细胞+Ge	0.5+0.5	3.6	1.8
	羊膜细胞+Xie	0.5+0.5	3.2	2.4
	Wu+Ge	0.5+0.5	29.8	27.6
阳性对照组	Ge+Xie	0.5+0.5	24.3	21.7
	Xie+Wu	0.5+0.5	23.4	22.2
阴性对照组	Wu	0.5	0.4	—
	Ge	0.5	1.8	—
	Xie	0.5	0.8	—

显示人羊膜上皮细胞对体外抗原刺激淋巴细胞激活反应有抑制作用。Wu、Ge、Xie分别代表三位自愿供血者的淋巴细胞。(图片来源: 本实验室)

于移植后在宿主体内的存活。

人羊膜上皮细胞在体外转染绿色荧光蛋白基因, 进行荧光标记。体外培养后, 注射到大鼠侧脑室, 吸附在室管壁上, 可以分化成室管膜上皮细胞。然后, 向室管壁下区迁移, 同时向神经组织分化。两个月后可以观察到分化的神经组织有着强烈的荧光(图4)。这一结果说明人的羊膜细胞对大鼠免疫系统具有免疫耐受, 能够在异种生物体内长期生存。

上述这些结果表明, 人羊膜上皮细胞保留胚胎干细胞特性, 能向三个胚层组织分化, 具有较强的分

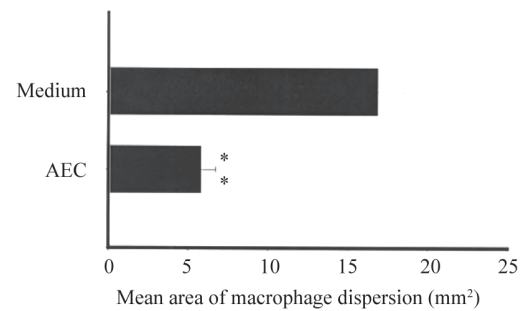


图5 显示羊膜上皮细胞(AEC)对巨噬细胞迁移的抑制作用。Medium为培养基, 表示未加AEC的巨噬细胞培养迁移。(图片来源: IOVS 2005; 46(3): 900-7.)

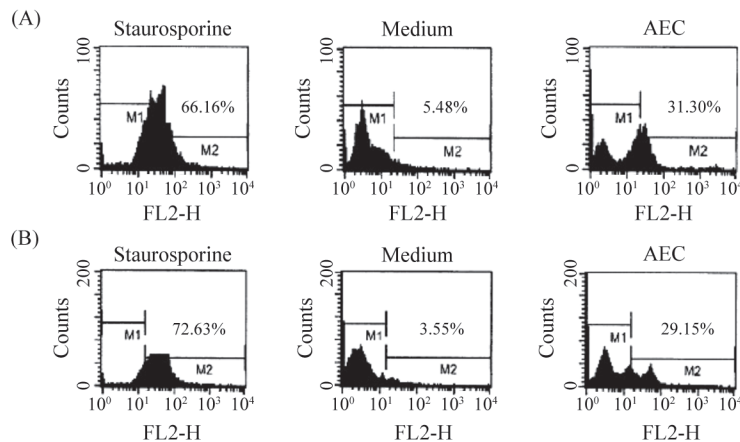


图6 显示羊膜上皮细胞(AEC)对激活的T、B淋巴细胞的调亡作用

A: T淋巴细胞的调亡情况; B: B淋巴细胞调亡情况。Staurosporine为星形孢菌素诱导淋巴细胞调亡, 作为调亡阳性对照; Medium为淋巴细胞在培养基内培养调亡情况, 作为阴性对照; AEC表示加了羊膜上皮细胞诱发淋巴细胞细胞调亡情况。(图片来源: IOVS 2005; 46(3): 900-7.)

化能力; 具有较好的免疫耐受能力, 移植时无需HLA或基因配型; 能够分泌多种抗炎因子, 具有很好的抗炎症功能; 因缺乏端粒酶, 在细胞体内不会增殖, 也就不会致癌, 因而移植是安全的; 人的羊膜容易取

得, 能够拿到大量细胞, 制备工艺简单, 质量容易得到控制。羊膜上皮细胞的这些特征, 基本能满足干细胞移植的标准要求, 故而具有临床广泛应用的美好前景。