

## 热点评析

# 人羊膜细胞临床前研究: 治疗非神经系统的损伤性疾病研究进展

郭礼和

本刊前两期(中国细胞生物学学报 2011; 33(5): 590-3、33(6): 720-3)分别介绍了人羊膜细胞在治疗神经损伤和神经退行性疾病方面的临床前研究, 强调了人羊膜上皮细胞在生化方面具有神经细胞特性, 说明它在治疗神经系统疾病方面具有许多优越性, 但并不否定它在治疗非神经系统的损伤性疾病的可能性。

本刊(中国细胞生物学学报 2011; 33(4): 451-4)曾介绍人羊膜细胞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, 保有最早的胚胎干细胞特性, 具有向三个胚层组织分化的潜能。在体外, 人羊膜细胞可以定向分化为: 内胚层来源的内脏器组织(如胰岛细胞和肝细胞等); 中胚层来源的骨骼和肌肉等组织; 外胚层来源的神经和皮肤等组织。除此之外, 人羊膜细胞向羊水分泌许多有利胚胎发育、生长和分化的细胞因子和营养因子(例如: EGF、KGF、HGF、bFGF、IGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、BDNF、NGF、NT3、IV胶原、整合素、层粘素等)。这些细胞因子和营养因子对组织损伤和修复有着良好的促愈作用。本文重点介绍人羊膜细胞在非神经系统的组织损伤临床前的研究进展。

## 1 糖尿病(Diabetes)

糖尿病属于常见的代谢内分泌疾病, 临床主要表现为血糖增高。通常病型可分为: I-型糖尿病、II-型糖尿病、妊娠糖尿病及其他特殊类型的糖尿病。根据发病机理, 糖尿病可分为原发性和继发性, 大多数病人为原发性的。原发性糖尿病又可分为胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)两类。I-型糖尿病为胰岛素依赖性; II-型糖尿病为非胰岛素依赖性, 但发病得不到控制后会转为I-型的。通常所见的糖尿病为II-型, 发病率占

90%以上。老人患的糖尿病一般为II-型, 通常与血脂高和过度肥胖有关。

糖尿病的患者易得并发症, 常见的并发症有: 感染性疾病(如肺结核病等)、溃疡性疾病(如糖尿病足)、血管性疾病(如动脉硬化)、心脏病、神经病(如皮肤麻痹)和酮尿症等。严重的会并发视网膜增生(可引起双目失明)、肾小球增生(引起肾衰竭)、酸中毒和脑中风等疾病。

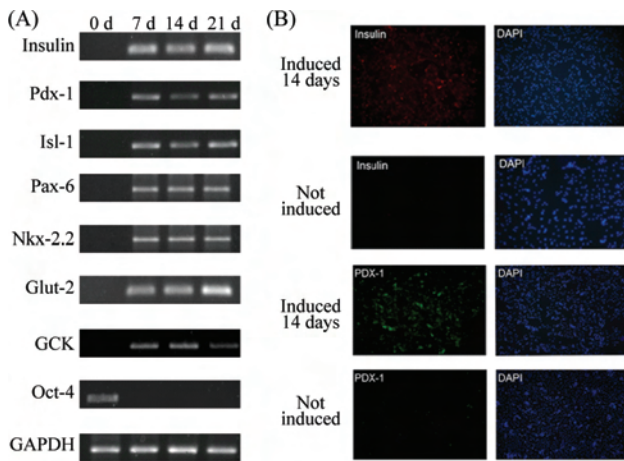
II-型糖尿病主要是药物治疗, 后期往往需要胰岛素配合治疗; I-型糖尿病目前主要使用胰岛素来治疗, 后期需要用胰岛移植来治疗, 这有胰岛组织来源和移植免疫排斥等问题。从长期来看, 干细胞治疗是一个方向; 但是, 目前还处在临床前研究阶段。用胚胎干细胞和诱导多能干细胞(iPS)在体外都能分化成分泌胰岛素的 $\beta$ -细胞; 也可用基因诱导将胰腺管壁细胞和皮肤成纤维细胞直接转化为 $\beta$ -细胞。

人羊膜上皮细胞在体内能够分化成 $\beta$ -细胞, Wei及其同事<sup>[1]</sup>的实验表明, 人羊膜上皮细胞注入糖尿病小鼠体内一个月内可使血糖水平维持正常, 并证明人羊膜上皮细胞在体内能分化成胰岛的 $\beta$ -细胞。

我们实验室是将人羊膜上皮细胞在体外直接诱导分化成胰岛的 $\beta$ -细胞<sup>[2]</sup>, 这种分化了的细胞在体外具有 $\beta$ -细胞各种分子标志, 能够分泌胰岛素(图1, 本文所有图片来源于本实验室)和人的C-肽(由细胞合成的胰岛素原前体(preproinsulin)在细胞器高尔基体内裂解得到的多肽, 与胰岛素同时分泌到胞外, 对它的浓度测定, 通常用来代表胰岛素分泌能力)。C-肽分泌水平依赖细胞外糖的浓度, 也就是细胞外糖浓度越高, C-肽分泌越多(也代表胰岛素分泌越多)(图2)。这种生理反应称作糖应答反应能力(glucose response), 也就是意味着血糖浓度越高, 胰岛素就会分泌越多; 血糖低了, 胰岛素就不分泌了, 不然就会

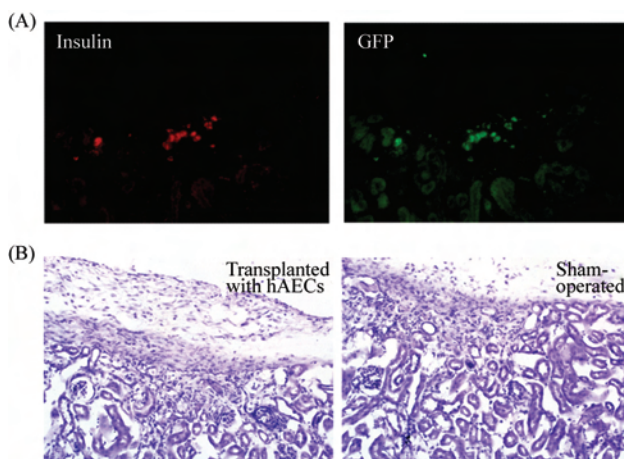
造成低血糖休克, 甚至造成生命危险。人羊膜上皮细胞在体外诱导成 $\beta$ -细胞后, 具有这种生理反应能力, 才有治疗疾病价值。移植到小鼠肾脏的包膜内能够生存下来。图3表明用绿色荧光标记的人羊膜上皮细胞分化成 $\beta$ -细胞, 然后移植到小鼠肾包膜一个月后仍然能看到绿色荧光。图4表明体外有诱导的 $\beta$ -细胞能够使患有糖尿病的小鼠保持正常的血糖水平, 未诱导的羊膜细胞不能下降血糖水平。图5表

明用高浓度葡萄糖液注射患有糖尿病的小鼠, 18分钟后血糖浓度达到最高(图中用空心圆代表), 随后直到120分钟血糖浓度还是降不下来, 缺乏血糖调控能力; 而用诱导的 $\beta$ -细胞治疗患糖尿病小鼠(图中用实心圆代表)到了60分钟后血糖浓度已经降到正常水平, 与不患糖尿病小鼠(图中用实心三角代表)的血糖水平控制能力相同。上述研究结果表明人羊膜上皮细胞有望用于人的糖尿病临床治疗。



A: 体外诱导不同时间表达 $\beta$ -细胞分子标志物, 0 d代表为诱导的羊膜细胞, 表达胚胎干细胞分子标志物Oct-4; 其它分别为体外诱导7 d、14 d和21 d, 这时羊膜细胞都已表达 $\beta$ -细胞分子标志物, 但不表达胚胎干细胞标志物Oct-4; B: 诱导14 d 表达 $\beta$ -细胞所特有的胰岛素(insulin)和PDX-1蛋白。

图1 体外诱导人羊膜上皮细胞分化成胰岛 $\beta$ -细胞



图中红色荧光代表分泌的胰岛素, 应与绿色的细胞(来源于人的羊膜细胞)在位置上应高重叠, 说明胰岛素是由羊膜细胞分化成的 $\beta$ -细胞分泌的。

图3 体外诱导的 $\beta$ -细胞(绿色荧光标记)移植到小鼠的肾脏包膜内, 30天后组织切片, 用人胰岛素抗体检测移植的细胞是否有人胰岛素分泌

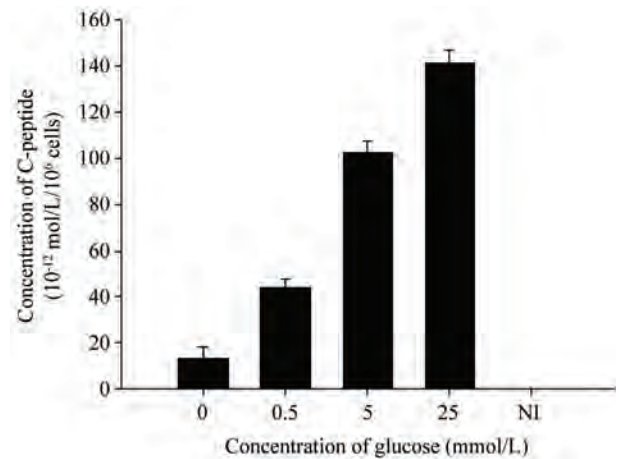
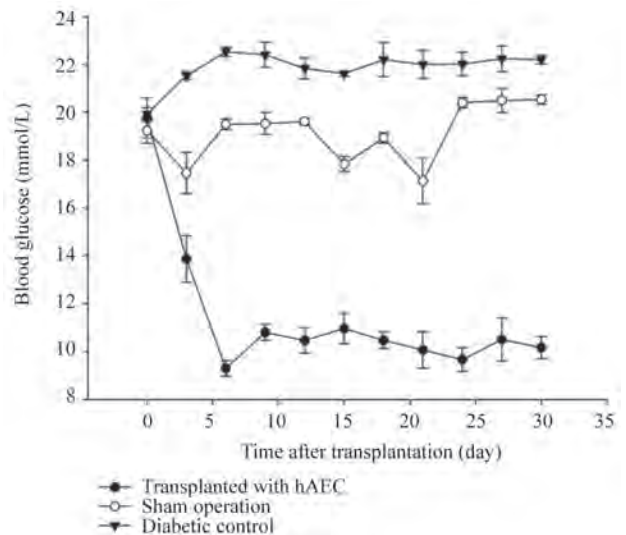
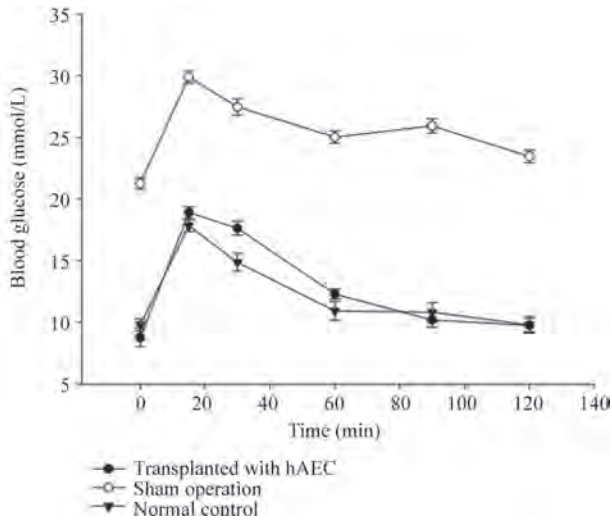


图2 诱导的 $\beta$ -细胞在体外培养分泌C-肽(代表胰岛素)的量依赖培养液中的葡萄糖浓度



黑心圆代表细胞治疗组, 注射诱导的 $\beta$ -细胞后第6天小鼠血糖下降到正常水平, 直到30天血糖水平一直保持正常; 黑三角代表患有糖尿病小鼠为给细胞治疗, 直到30天血糖一直保持高水平; 空心圆代表未在体外诱导的人羊膜上皮细胞治疗糖尿病效果不明显。

图4 体外诱导的 $\beta$ -细胞移植到患有糖尿病的小鼠肾脏包膜内, 观测细胞治疗对小鼠血糖的控制



空心圆代表未用细胞治疗的血糖水平, 注射20 min后血糖浓度达到最高, 但直到120 min后血糖浓度仍然很高; 黑心圆代表细胞治疗鼠的血糖水平; 黑三角代表不患糖尿病鼠的血糖水平(作为对照组)。

图5 移植的 $\beta$ -细胞移植到患有糖尿病鼠的肾脏胞膜内, 30天后注射高浓度葡萄糖, 观测该鼠对血糖的调节

## 2 肌肉疾病

杜兴氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种X连锁隐性遗传的进行性肌萎缩疾病, 主要由抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因缺陷引起。该基因有79个外显子(exon)组成, 位于X染色体短臂(Xp21), 是人类最大的基因。其编码的蛋白——抗肌萎缩蛋白, 是一种肌纤维膜结构蛋白, 在维持肌细胞膜结构完整性中起重要作用。一般患者在5岁以前发病, 临床表现为进行性对称性肌无力, 以肢体近端受累多见, 起病常于下肢开始, 上楼梯或蹲起困难。体检无肌颤, 无感觉障碍, 多伴有腓肠肌假性肥大。病情呈进行性发展, 以致生活不能自理, 最后完全丧失活动能力, 多半导致呼吸衰竭或肺部感染而死亡。疾病的治疗手段主要有基因治疗、骨髓移植和药理学治疗, 但治疗效果不佳。

目前, 干细胞治疗研究可能会带来一线希望。Kawamichi及其同事<sup>[3]</sup>研究人羊膜间充质细胞(羊膜含有的另一种干细胞)在体外诱导分化能成为肌小管。若将该细胞移植到患DMD疾病的小鼠体内, 该鼠的肌纤维膜上表达了人的抗肌萎缩蛋白(dystrophin)和层粘连蛋白(laminin)。他们认为这种表达可能出于两种不同的机制: 一种是移植的人羊膜间充质细胞分化成肌纤维细胞; 另一种是移植细胞与宿主细胞的融合。

## 3 血管疾病

外周血管病变(peripheral vascular disease, PVD), 通常指外周动脉病变或外周动脉闭塞病变(peripheral arterial disease, PAD或peripheral artery occlusive disease, PAOD), 一般远离冠状动脉或脑区。PVD是由动脉粥样硬化和炎症反应导致狭窄、栓塞、血块形成, 造成急性或慢性缺血(血供不足), 晚期会造成严重肢体缺血(critical limb ischemia, CLI)。

Ishikane等<sup>[4]</sup>利用来源孕鼠胎膜(羊膜是其组成部分)的间充质细胞移植到后肢缺血的老鼠。细胞移植三周后, 他们观测到老鼠后肢的血流量明显增加, 缺血肌肉的毛细血管与肌纤维之比的比值大大提升。虽然未见移植细胞的分化或与宿主细胞融合, 但不能排除移植细胞的旁分泌细胞因子刺激血管生成; 或动员宿主干细胞/祖细胞迁移到病灶区加速血管生成。

Prather等<sup>[5]</sup>利用胎盘间充质细胞移植到患CLI小鼠, 可看到缺血的后肢血流量明显加大, 毛细血管密度增加, 减少氧化应激和内皮细胞损伤, 后肢功能有所改善。最近的临床试验表明这种细胞治疗是安全的, 病人的生活质量得到了改善。

## 4 肺和肝的纤维化病变

纤维化是指机体组织过度生长、硬化和疤痕形成。任何原因只要能引起组织细胞损伤, 均可导致组织细胞发生变性、坏死和炎症反应, 如果损伤很小, 损伤细胞周边正常实质细胞将发生增生修复, 这种修复可完全恢复正常的结构和功能。然而, 如果损伤较大或反复损伤超出了损伤周围实质细胞的再生能力时, 间质纤维结缔组织(细胞外基质)将大量增生对缺损组织进行修复, 即发生纤维化的病理改变。因此, 本质上纤维化是组织遭受损伤后的修复反应, 以保护组织器官的相对完整性。增生的纤维结缔组织虽然修复了缺损, 但却不具备原来器官实质细胞的结构和功能。如果这种修复反应过度、过强和失控, 就会引起器官的纤维化和导致器官的功能下降。由此可见, 纤维化是指由于炎症导致器官实质细胞发生坏死, 组织内细胞外基质异常增多和过度沉积的病理过程。轻者成为纤维化, 重者引起组织结构破坏而发生器官硬化。纤维化(fibrosis)可发生于多种器官, 主要病理改变为器官组织内纤维结缔组织增多, 实质细胞减少, 持续进展可致器

官结构破坏和功能减退, 乃至衰竭, 严重威胁人类健康和生命。

肺纤维化是指终末期的间质性肺疾病, 肺泡塌陷失去上皮细胞, 形成蜂窝样改变, 呼吸功能不可逆地丧失。蜂窝样改变是瘢痕和结构重组的一种表现。

Cargnoni等<sup>[6]</sup>无论用人或鼠的羊膜上皮细胞、羊膜间充质细胞或绒毛膜间充质细胞移植到患有肺纤维化的小鼠, 都能明显减轻肺纤维化的严重程度, 并可看到嗜中性粒细胞浸润减少。尽管在宿主肺部观测到的移植细胞不多, 他们认为治疗效果可能同移植细胞的旁分泌可溶性分子有关。

Moodley及其同事<sup>[7]</sup>认为, 人羊膜上皮细胞具有抗炎作用, 在小鼠肺内同样能抑制炎症反应, 从而达到治疗肺纤维化的疗效。另外, 他们也看到原始的人羊膜上皮细胞在体外能表达肺组织相关的分子标志物, 在特殊的分化培养基上能产生和释放II型肺细胞膜蛋白和表现出典型层状体(lamellar bodies typical)。人羊膜上皮细胞移植到博来霉素引发的免疫缺陷小鼠体内, 会在小鼠的肺部表达细胞膜蛋白, 表明移植的细胞已经在体内分化成II-型肺细胞。移植的人羊膜上皮细胞会减少肺部的促炎症细胞因子(白介素-1、白介素-6、TNF- $\alpha$ )和促纤维化细胞因子(TGF- $\beta$ )。此外, 在损伤的肺组织内, 人羊膜上皮细胞移植会减少肺的纤维化和胶原纤维沉积, 并诱导胶原纤维降解环境形成(改变蛋白酶水平)。

肝纤维化是指由各种致病因子引起肝脏炎症反应及免疫应答, 引发组织过度修复, 导致结缔组织异常增生, 肝内细胞外基质弥漫性过度沉淀, 引起肝纤维化, 造成肝脏损害。其病因大致可分为感染性(慢性乙型、丙型和丁型病毒性肝炎, 血吸虫病等), 先天性代谢缺陷(肝豆状核变性、血色病、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏症等)及化学代谢缺陷(慢性酒精性肝病、慢性药物性肝病)及自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎等。

很早, 人们就知道人羊膜上皮细胞能产生和分泌血清白蛋白及甲胎蛋白。Sakuragawa及其同事<sup>[8]</sup>提出用羊膜细胞作为基因载体用来治疗肝病, 因为羊膜来源的细胞在体内外都可分化成肝组织家系的细胞, 并能在肝内存活。

Manuellai等<sup>[9]</sup>用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导肝纤维化的小鼠模型来研究人羊膜上皮细胞移植治疗效果。

人羊膜上皮细胞移植后能明显减少干细胞的凋亡、肝的炎症反应和纤维化, 并伴随促炎症因子(TGF- $\beta$ 、IL-6和TGF- $\alpha$ )的减少和抗炎症细胞因子(IL-10和胶原酶)表达的增加; 产生胶原蛋白的活化肝星形细胞数量也明显减少。

Parolini实验室<sup>[10]</sup>最近用羊膜片治疗老鼠胆道纤维化病变(胆管结扎造模)。用羊膜片作补丁放在肝脏表面, 能够明显地减少和延缓肝的纤维化。人羊膜片补丁为什么能有如此治疗效果, 其机制还不清楚。用这种治疗方式在肝脏区域并未观测到人的羊膜细胞生存, 应该不是细胞替代机制, 可能是人羊膜片上的细胞旁分泌作用, 释放出可溶性细胞因子。

## 5 心肌梗死(myocardial infarction, MI)

心肌梗死是指急性、持续性缺血、缺氧(冠状动脉功能不全)所引起的心肌坏死。心肌梗死90%以上是由于冠状动脉粥样硬化病变基础上血栓形成而引起的。临床上多有剧烈而持久的胸骨后疼痛, 休息及硝酸酯类药物不能完全缓解, 伴白细胞增高、发热、血沉加快、血清心肌酶活性增高及进行性心电图变化, 可并发心律失常、休克或心力衰竭等合并症, 常可危及生命。心肌梗死发生常有一些诱因, 包括过劳、情绪激动、大出血、休克、脱水、外科手术或严重心律失常等。

虽然胎盘来源的细胞能否分化成心肌细胞仍有争议, 但已有一些实验室利用这些细胞作了研究。Fujimoto等<sup>[11]</sup>用同基因型的大鼠羊膜细胞移植到心肌梗塞大鼠, 观测了六周, 发现移植的细胞能够生存, 并能明显减少心肌疤痕形成和阻止心肌变薄(myocardial thinning)。对此结果提出了两种解释: 1) 移植的羊膜细胞分化成心肌细胞或血管内皮细胞和平滑肌细胞; 2) 移植的细胞刺激心肌血管生成和阻止心肌细胞凋亡。

Ventura及其同事<sup>[12]</sup>使用胎膜来源细胞治疗心肌梗塞老鼠, 观测了四周, 看到了毛细血管密度增加, 左心室功能恢复正常, 疤痕减少。移植的细胞可能提供了血管生成因子和抗凋亡因子, 移植的细胞可能分化成血管细胞。

羊膜、羊膜细胞及胎膜细胞在上述神经损伤及退行性疾病、糖尿病、肌肉疾病、肺和肝的纤维化病变、心肌病等方面已经有了许多临床前的研究, 在组织工程、软骨缺陷、辅助造血干细胞移植和扩

增等方面也有许多临床前研究, 由于篇幅限制, 不在这里一一叙述了。

### 参考文献(References)

- 1 Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, *et al.* Human amnionisolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12: 545-52.
- 2 Hou Y, Huang Q, Liu T, Guo L. Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; 40: 830-9.
- 3 Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, *et al.* Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol* 2010; 223: 695-702.
- 4 Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, *et al.* Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* 2008; 26: 2625-33.
- 5 Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, Tschope C, Horwitz EM. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytherapy* 2009; 11: 427-34.
- 6 Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, *et al.* Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009; 18: 405-22.
- 7 Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams ED, *et al.* Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 643-51.
- 8 Sak-uragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, *et al.* Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 2000; 45: 171-6.
- 9 Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, *et al.* Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplant* 2010; 19(9): 1157-68.
- 10 Sant'anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant* 2011; 20(3): 441-53.
- 11 Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, *et al.* Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. *Cell Transplant* 2009; 18: 477-86.
- 12 Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, *et al.* Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem* 2007; 282: 14243-52.