

# 羊水来源干细胞骨向分化的研究进展

司家文<sup>1</sup> 沈国芳<sup>1\*</sup> 郭礼和<sup>2\*</sup><sup>1</sup>上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面科, 上海 200011;<sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 2007年, de Coppi等在*Nature Biotechnology*杂志上报道了从羊水中获取具有多向分化潜能的干细胞亚群的实验结果, 证明羊水细胞除了用于产前诊断之外, 还可成为极具前景的干细胞源。羊水来源干细胞, 作为一种特殊来源的干细胞类型, 具有独特的细胞生物学特性和广泛的多向分化潜力。随着研究的深入, 羊水来源干细胞在骨组织再生领域逐渐突显其潜在的研究和应用价值, 有必要就近年来羊水来源干细胞特性及其成骨分化的研究进展进行综述, 从而为相关领域的研究提供参考。

**关键词** 羊水; 干细胞; 骨向分化; 骨组织工程

## Research Progress on Osteogenic Differentiation of Amniotic Fluid-derived Stem Cells

Si Jiawen<sup>1</sup>, Shen Guofang<sup>1\*</sup>, Guo Lihe<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China)

**Abstract** In 2007, de Coppi *et al* reported the isolation of a stem-cell subpopulation with multi-differentiation potential from amniotic fluids in the journal of *Nature Biotechnology*, which prove that amniotic fluids may become a promising source of stem cells, in addition to specimens for prenatal diagnosis. Amniotic fluid-derived stem cell, a special type of stem cells, has been shown to possess unique biological characteristics and a comprehensive multi-differentiation potential. With further research, amniotic fluid-derived stem cells gradually show the potential value of research and application in osteogenic tissue regeneration. So it is necessary to review the research progress on characteristics and osteogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells, which may provide references for other relevant study.

**Key words** amniotic fluid; stem cells; osteogenic differentiation; bone tissue engineering

随着干细胞基础及应用研究不断取得突破性进展, 干细胞技术作为生命科学领域又一闪亮的研究热点, 在生物学、胚胎发育学、医学、药学等方面展现出越来越广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。羊水来源干细胞(amniotic fluid derived stem cell, AFSC), 作为一类处于胚胎干细胞与成体干细胞的过渡阶段的特殊干细胞群, 以其培养简便、具高度增殖分化潜能、免疫

原性低、无致瘤性、不涉及伦理学问题等独特优势<sup>[2]</sup>, 在细胞治疗和再生医学领域展现出巨大的临床应用前景, 正受到越来越多科学家和临床医生的关注。AFSC在口腔医学尤其是颌面部骨组织再生方面具有潜在的研究和应用价值, 值得国内同行共同探索研究, 因此, 笔者就近年来羊水来源干细胞及其骨向诱导分化的研究现状和相关问题作一综述。

收稿日期: 2013-04-10 接受日期: 2013-05-06

上海市科委重点基础项目(批准号: 10JC140870)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-23271251, E-mail: maxillofac Surg@163.com; Tel: 021-51623022-807, E-mail: guolihe@cell-star.com.cn

Received: April 10, 2013 Accepted: May 6, 2013

This work was supported by the Shanghai Science and Technology Key Project (Grant No.10JC140870)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-23271251, E-mail: maxillofac Surg@163.com; Tel: +86-21-51623022-807, E-mail: guolihe@cell-star.com.cn

网络出版时间: 2013-07-24 11:01

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130724.1101.002.html

# 1 羊水与羊水来源干细胞

## 1.1 羊水及羊水细胞

羊水存在于羊膜囊内,随着胎儿的发育,羊水逐渐充满羊膜囊。羊水内包含有水、蛋白质、碳水化合物、脂类、胎儿尿和电解质等成分,随着胎儿的生长发育,其体积和成分都发生不断改变,此外,羊水中还含有大量不同组织来源的异源性细胞群,这些细胞主要来自于羊膜上皮、胎儿皮肤、胎儿消化道、呼吸道及尿道等的脱落细胞<sup>[3]</sup>。新近的证据表明,羊水细胞中包含具有多向分化潜能的干细胞亚群,羊水来源干细胞在不同体外培养环境中可诱导分化为肝细胞、神经细胞、肌细胞、血管内皮细胞、脂肪细胞、骨细胞及软骨细胞等三胚层来源的组织细胞<sup>[4-6]</sup>(图1)。

## 1.2 羊水来源干细胞

随着研究的深入,AFSC的分离纯化方法不断进步,国内外文献报道的方法主要有一次贴壁培养法、二期贴壁培养法、流式细胞仪分选法、免疫磁珠分选法、初始细胞分选法及微流体体积分选法等<sup>[2,7-8]</sup>。上述分离获得的AFSC为梭形或圆形间充质细胞,具有贴壁生长的特点,多次传代后细胞不发生明显形态改变,且能保持其端粒酶的长度和活性<sup>[9]</sup>。de Coppi等<sup>[4]</sup>利用磁珠分选方法分离获得AFSC后发现,这些细胞具有很高的自我复制能力,经过48~72小时即可传代,倍增时间为36小时,细胞可持续传代超过250代,且多次倍增后仍可分化为三

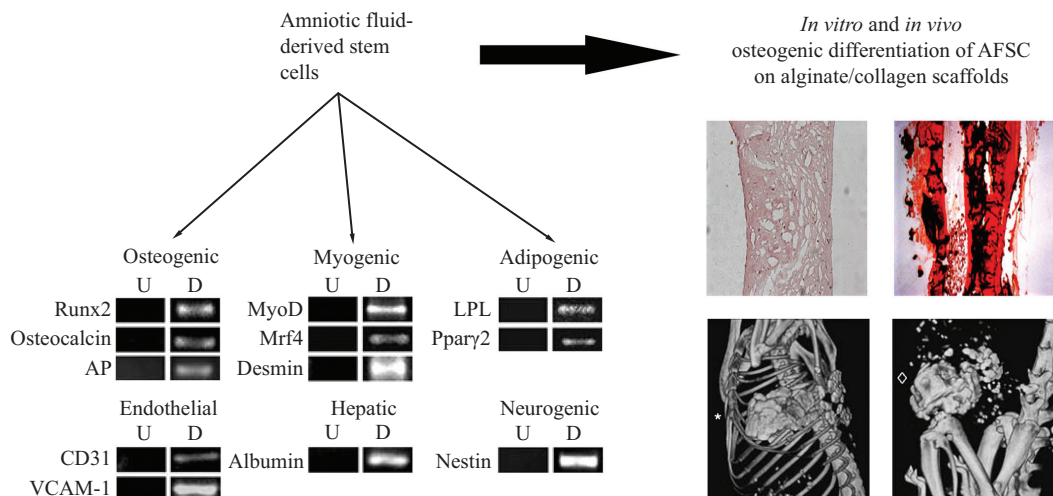
胚层组织细胞。进一步研究5~25代AFSC蛋白表达水平显示,AFSC传代过程中细胞的表面标志物、核型、细胞周期和凋亡率无明显变化,但部分细胞内信号分子、蛋白酶体、细胞骨架蛋白等蛋白表达水平在不同代数间波动明显<sup>[10]</sup>。

对AFSC的表面标志物研究显示,AFSC表达人胚胎干细胞特异性标志物OCT-4、Nanog、SSEA-4、SOX2,表达MHC I类分子(HLA-A、B、C抗原),还表达成体间充质干细胞标志物CD29、CD44、CD58、CD73、CD90、CD105、CD117和CD166,不表达CD34、CD45、HLA-DR、ABCG2、C-MET、SSEA-1、SSEA-3、TRA-1-60和TRA-1-80等标志物<sup>[3,11]</sup>。值得注意的是,OCT-4、Nanog、SSEA-4、SOX2是一类关键的胚胎干细胞标记物,它们组成的多能性核心调控网络可以抑制组织特异性基因表达,保持细胞的多能性和自我更新能力<sup>[12]</sup>。这一特殊的细胞标志物表达谱也提示AFSC是较成体干细胞更原始的一类细胞,具备更强的体外增殖分化潜力。

此外,AFSC培养过程中不发生同期分化,在维持和扩增时都不需要饲养层细胞,对已分离细胞可进行冻存,且复苏后细胞复苏后细胞存活率高,细胞表型及多向分化潜能并不受影响,因此适宜进行大规模培养和储存<sup>[13-14]</sup>。

## 2 羊水来源干细胞骨向分化研究及应用

组织器官的损伤或功能障碍是人类健康所面临



U: 未诱导细胞组; D: 诱导分化细胞组。

U: uninduced cell group; D: induced differentiation cell group.

图1 AFSC在不同体外培养环境中可诱导分化为三胚层来源的组织细胞(根据参考文献[4]改编)

Fig.1 AFSC can be induced to differentiate into all three germ layers *in vitro*(modified from reference [4])

的主要危害之一,快速发展的干细胞技术为组织器官重建的细胞治疗和再生医学提供了理想的细胞来源。自AFSC被成功分离后,许多学者将其应用于骨再生研究领域,取得了一系列重要的体内外实验结果。

### 2.1 羊水来源干细胞骨向诱导分化研究

de Coppi等<sup>[4]</sup>使用含有维生素C、 $\beta$ -甘油磷酸、地塞米松的培养基成功诱导AFSC骨向分化,这些体外诱导分化的AFSC细胞碱性磷酸酶(ALP)呈阳性表达,培养基内可形成矿物质沉积,将接种有分化后AFSC的胶原支架植入免疫缺陷小鼠皮下18周后可形成高度钙化的异位骨样组织。Antonucci等<sup>[15]</sup>报道了从羊水中获取贴壁细胞并在适量扩增后直接进行体外成骨诱导的新的一步培养法诱导AFSC骨向分化,证实诱导分化后AFSC可表达I型胶原、OPN、Osteocalcin、BSP、Runx2等全部成骨细胞标志物。还有学者使用原子力显微镜观察骨向诱导0、7、14、21天的AFSC发现,骨向诱导后AFSC细胞表面钙化颗粒体积明显增加,细胞内肌动蛋白骨架发生重排,厚的应力纤维被替换成薄的网状肌动蛋白纤维,也提示AFSC在诱导条件下可向成骨细胞分化<sup>[16]</sup>。此外,还有学者研究发现rhBMP-7、辛伐他汀、LIM矿化蛋白等均可显著促进AFSC的成骨分化,其具体作用机制有待进一步研究探讨<sup>[17-19]</sup>。值得注意的是,Rodrigues等<sup>[20]</sup>和Peister等<sup>[21]</sup>对AFSC与BMSC在PCL支架中骨向分化对比研究显示,AFSC骨向诱导早期钙沉积量较少而I型胶原沉积量多,4周后AFSC钙化组织沉积量逐渐超过BMSC,在第10周时钙化组织总量及分布范围均明显超过BMSC组。上述研究提示,AFSC具有明确的骨向分化能力,不同的组织来源赋予AFSC特殊的细胞生物学特性,其独特的成骨相关基因表达特征可能使AFSC具有较BMSC延迟而更为强大的成骨能力,而AFSC与其他来源干细胞的差异及其骨向分化调控机制尚有待进一步的研究。

### 2.2 羊水来源干细胞骨组织工程应用研究

以具有持续自我更新和多细胞系分化潜力的种子细胞为基础的骨组织工程技术是骨缺损重建治疗中迅速发展的新方法。最近的研究显示,纳米纤维支架材料、蚕丝蛋白支架均可在体内外诱导AFSC的骨向分化并形成异位骨组织<sup>[22]</sup>。micro-CT扫描显示,骨向分化后的AFSC细胞可在PCL支架材料内形成广泛的钙化组织,将载有AFSC的支架材料接种于裸鼠皮下可形成钙化程度7倍于体外培养条

件下的异位骨组织<sup>[23]</sup>。Klein等<sup>[24]</sup>接种兔AFSC于纳米纤维支架材料上并给予体外骨向诱导培养后,将其植入兔全层胸骨缺损处,材料植入后18周实验组胸骨缺损被新生骨组织修复封闭,而无细胞支架组未见良好骨性愈合。Berardinelli等<sup>[25]</sup>应用接种有羊AFSC的商品化MgHA/collagen支架行羊上颌窦外提升术,相较无细胞支架植入组,AFSC可以明显提高骨组织形成量及局部血管化水平,极大地促进支架材料的生物功能。Turner等<sup>[26]</sup>分别用接种有兔AFSC的纳米聚左旋乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)支架和无细胞空白支架修复兔颅骨全层缺损,并于移植后8周对所有实验动物进行骨修复比较分析,结果显示所有实验动物缺损处均有新生骨形成,但接种细胞组局部骨组织密度及细胞外矿化水平明显高于对照组,且成骨效应更为稳定。上述研究显示,AFSC可以有效参与骨组织工程重建,而如何能够制备出适合AFSC植入和分化为骨组织的支架材料尚有待深入的研究,此外,更多的体内试验尚需进行以评估AFSC在骨组织工程应用中的成骨效率及移植安全性等问题。

## 3 结论与展望

从羊水中分离得到AFSC对细胞治疗和再生医学领域产生令人振奋的影响,不仅具有培养简便、具高度增殖分化潜能、可长期储备、无致瘤性、不涉及伦理学问题等独特优势,而且还能避开在细胞移植中称为“供体-受体HLA匹配”的技术难题。在孕期分离培养扩增获得的大量干细胞可为患有先天性畸形的新生儿带来福祉,为成人疾患干细胞治疗的自体应用储备细胞源。国内部分地区已着眼建立脐血、羊水、胎盘干细胞库等联合组织工程库,未来可能形成新的产业。目前,对于其特点和应用还有许多方面的研究亟需深入,具体包括如下几个方面。

(1)AFSC尚未建立可用于大规模精确筛选的标准化方法,目前的筛选分离方法所获得AFSC多是异源性干细胞群,进一步研究AFSC细胞的分类和来源是必要的,这些研究将有利于AFSC分离、培养和纯化技术的进步,从而能够形成系统有效的培养体系,为其进一步的研究和应用打下坚实基础。

(2)AFSC具有特殊的生物学特性,其定向诱导潜能、与其他来源干细胞的差异及向特定细胞类型的分化调控机制尚有待复杂而深入的研究。

(3)在组织工程应用方面,如何能够制备出适合

AFSC植入、培养和分化为特定组织器官且具备生物相容性的支架材料值得学者研究和探讨。

(4)更多的体内试验尚需进行以评估AFSC在组织工程方面的免疫排斥及移植安全性等问题。

(5)AFSC具有高效转染表达外源性目的基因的特性<sup>[27-28]</sup>,进一步探索修饰AFSC的方法和技术也具有较高的研究价值。

(6)此外,具有广泛多能性和较高倍增速度的AFSC还是研究组织胚胎发育和药物筛选的极好工具。

总之,AFSC的基础和应用研究尚处于起步阶段,尽管许多研究结果令人振奋,但更为深入而系统的研究尚待进行,作为一种极具希望的新型干细胞,AFSC有望成为科学研究和临床治疗的理想细胞源。

### 参考文献 (References)

- 1 Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 678-84.
- 2 Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: Marker discovery. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 107836.
- 3 Dobrev MP, Pereira PN, Deprest J, Zwijsen A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol* 2010; 54(5): 761-77.
- 4 de Coppi P Jr, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25(1): 100-6.
- 5 Chen J, Lu Z, Cheng D, Peng S, Wang H. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *PLoS One* 2011; 6(5): e19964.
- 6 Park SB, Seo MS, Kang JG, Chae JS, Kang KS. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *Cytotherapy* 2011; 13(3): 341-9.
- 7 Wu HW, Lin XZ, Hwang SM, Lee GB. A microfluidic device for separation of amniotic fluid mesenchymal stem cells utilizing lower-array structures. *Biomed Microdevices* 2009; 11(6): 1297-307.
- 8 Phermthai T, Odglun Y, Julavijitphong S, Titapant V, Chuenwattana P, Vantanasiri C, *et al.* A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 79.
- 9 Joo S, Ko IK, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch Pharm Res* 2012; 35(2): 271-80.
- 10 Chen WQ, Siegel N, Li L, Pollak A, Hengstschlager M, Lubec G. Variations of protein levels in human amniotic fluid stem cells CD117/2 over passages 5-25. *J Proteome Res* 2009; 8(11): 5285-95.
- 11 Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, *et al.* Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif* 2007; 40(1): 75-90.
- 12 孔倩颖. Oct4及其亚型调控细胞多能性的研究进展. *国际口腔医学杂志(Kong Qianying. Research progress on pluripotency regulation by Oct4 and its isoforms. Journal of International Stomatology)* 2011; 38(1): 98-101.
- 13 Angelo PC, Ferreira AC, Fonseca VD, Frade SP, Ferreira CS, Malta FS, *et al.* Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genet Mol Res* 2012; 11(2): 1002-12.
- 14 Janz FL, Debes AA, Cavaglieri RC, Duarte SA, Romao CM, Moron AF, *et al.* Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 649353.
- 15 Antonucci I, Iezzi I, Morizio E, Mastrangelo F, Pantalone A, Mattioli-Belmonte M, *et al.* Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol. *BMC Biotechnol* 2009; 9: 9.
- 16 Chen Q, Xiao P, Chen JN, Cai JY, Cai XF, Ding H, *et al.* AFM studies of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells. *Anal Sci* 2010; 26(10): 1033-7.
- 17 Sun H, Feng K, Hu J, Soker S, Atala A, Ma PX. Osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells induced by bone morphogenetic protein-7 and enhanced by nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 2010; 31(6): 1133-9.
- 18 de Lara Janz F, Favero GM Jr, Bohatch MS, Aguiar Debes A, Bydlowski SP. Simvastatin induces osteogenic differentiation in human amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFMSC). *Fundam Clin Pharmacol* 2012; doi: 10.1111/fcp.12006.
- 19 Barba M, Pirozzi F, Saulnier N, Vitali T, Natale MT, Logroscino G, *et al.* Lim mineralization protein 3 induces the osteogenic differentiation of human amniotic fluid stromal cells through Kruppel-like factor-4 downregulation and further bone-specific gene expression. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 813894.
- 20 Rodrigues MT, Lee SJ, Gomes ME, Reis RL, Atala A, Yoo JJ. Amniotic fluid-derived stem cells as a cell source for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(23/24): 2518-27.
- 21 Peister A, Woodruff MA, Prince JJ, Gray DP, Huttmacher DW, Guldberg RE. Cell sourcing for bone tissue engineering: Amniotic fluid stem cells have a delayed, robust differentiation compared to mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 2011; 7(1): 17-27.
- 22 Maraldi T, Riccio M, Resca E, Pisciotta A, La Sala GB, Ferrari A, *et al.* Human amniotic fluid stem cells seeded in fibroin scaffold produce *in vivo* mineralized matrix. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(21/22): 2833-43.
- 23 Peister A, Deutsch ER, Kolambkar Y, Huttmacher DW, Guldberg RE. Amniotic fluid stem cells produce robust mineral deposits on biodegradable scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(10): 3129-38.
- 24 Klein JD, Turner CG, Ahmed A, Steigman SA, Zurakowski D, Fauza DO. Chest wall repair with engineered fetal bone grafts: an efficacy analysis in an autologous leporine model. *J Pediatr Surg* 2010; 45(6): 1354-60.
- 25 Berardinelli P, Valbonetti L, Muttini A, Martelli A, Peli R, Zizzari V, *et al.* Role of amniotic fluid mesenchymal cells engineered on MgHA/collagen-based scaffold allotransplanted on an experimental animal study of sinus augmentation. *Clin Oral Investig* 2012; doi: 10.1007/s00784-012-0857-3.
- 26 Turner CG, Klein JD, Gray FL, Ahmed A, Zurakowski D, Fauza DO. Craniofacial repair with fetal bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *J Surg Res* 2012; 178(2): 785-90.
- 27 Grisafi D, Piccoli M, Pozzobon M, Ditadi A, Zaramella P, Chianchetti L, *et al.* High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. *Stem Cells Dev* 2008; 17(5): 953-62.
- 28 Galende E, Karakikes I, Edelmann L, Desnick RJ, Kerenyi T, Khoueiry G, *et al.* Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells. *Cell Reprogram* 2010; 12(2): 117-25.