

人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞的生物学性状比较

胡超群^{1,2} 方姝煜² 龚梦嘉² 毕杨² 何昀^{1,2*}

¹重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆), 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014;

²重庆医科大学附属儿童医院儿研所干细胞实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨人尿源性干细胞(human urine-derived stem cells, hUSCs)及人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)的生物学性状差异。分离培养hUSCs及hUC-MSCs, 显微镜下观察细胞形态, 流式细胞术检测干细胞表面标记物, 锥虫蓝拒染实验及克隆形成实验检测细胞增殖能力, 划痕实验及Transwell迁移实验检测细胞迁移能力, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、茜素红染色、油红O染色及阿利新蓝染色评估多向分化潜能。hUSCs为米粒状贴壁生长细胞, hUC-MSCs为长梭形贴壁细胞, 呈旋涡状排列生长, 两种细胞表型分析相似, 均表达多种间充质干细胞标志物, 但CD24在hUC-MSCs表达阳性, 而CD105在hUSCs表达阳性。hUC-MSCs的增殖及迁移能力优于hUSCs, 但后者的克隆形成能力更强。hUSCs及hUC-MSCs都具有成骨、成脂、成软骨分化能力, hUC-MSCs的成骨能力强而hUSCs的成脂能力强。该研究成功分离培养出增殖能力强并具有多向分化潜能的hUSCs, 该细胞与hUC-MSCs相比具有相似的生物学性状, 可作为再生医学自体移植的理想种子细胞来源。

关键词 人尿源性干细胞; 人脐带间充质干细胞; 增殖; 迁移; 多向分化

Comparison of Biological Characteristics of Human Urine-Derived Stem Cells and Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

HU Chaoqun^{1,2}, FANG Shuyu², GONG Mengjia², BI Yang², HE Yun^{1,2*}

¹Department of Neonatal Gastrointestinal Surgery, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing), China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; ²Stem Cell Biology and Therapy Laboratory, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of the research was to investigate and compare the biological characteristics of hUSCs (human urine-derived stem cells) and hUC-MSCs (human umbilical cord mesenchymal stem cells). hUSCs and hUC-MSCs were isolated and cultured. The cell morphology was observed under microscope. Flow cytology was used to detect the stem cell surface markers. The proliferation ability was detected by trypan blue staining and colony formation assay. The migration ability was detected by wound-healing assay and transwell migration assay, ALP

收稿日期: 2019-10-08

接受日期: 2019-11-25

重庆市科委基础研究与前沿探索项目(批准号: cstc2018jcyjAX0111)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63633113, Email: dr_yunhe@hospital.cqmu.edu.cn

Received: October 8, 2019 Accepted: November 25, 2019

This work was supported by Chongqing Municipal Science and Technology Commission Basic Research and Frontier Exploration Project (Grant No.cstc2018jcyjAX0111)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: dr_yunhe@hospital.cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5176>

(alkaline phosphatase) staining, alizarin red staining, oil red O staining and alcian blue staining were performed to evaluate the multi-directional differentiation potential. hUSCs were rice-like adherent growth cells. hUC-MSCs were long spindle-shaped adherent cells which showed a spiral-like growth. The phenotypic analysis of the two cells was similar, both of the cells expressed multiple mesenchymal stem cell markers, but CD24 was positively expressed in hUC-MSCs while CD105 was positively expressed in hUSCs. The proliferation and migration ability of hUC-MSCs was superior to that of hUSCs, but the latter had stronger clonality. Both hUSCs and hUC-MSCs had the ability of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. The osteogenesis ability of hUC-MSCs is stronger, while the adipogenic ability of hUSCs is stronger. We successfully isolated and cultured hUSCs with strong proliferative capacity and multi-directional differentiation potential. Compared with hUC-MSCs, hUSCs have similar biological characteristics and can be used as an ideal seed cell source for autologous transplantation in regenerative medicine.

Keywords human urine-derived stem cells; human umbilical cord mesenchymal stem cells; proliferation; migration; multiple differentiation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于骨髓、脐血、脐带、胎盘、动员外周血、脂肪组织、牙髓等组织的细胞^[1],具有再生、抗炎及免疫调节潜力,是组织工程中的重要细胞来源。MSC虽然来源多样,但具有共同的生物学特性:(1)成纤维细胞状细胞形态,通常为梭状或纺锤状;(2)细胞贴壁生长,且增殖率很高;(3)表面表达CD90、CD105、CD73等标志物;(4)具有分泌胰岛素样生长因子及血管内皮生长因子和肝细胞生长因子的能力;(5)一定条件诱导下可分化成为特定的细胞^[2-3]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是目前研究中较常用的MSC,常作为骨组织工程的种子细胞,但其侵入性手术创伤较大^[4-6],采集需要患者的整体状态良好,并提前进行细胞动员,且随着供体年龄的增长,其分化能力也会减弱,在实际应用中存在诸多问题。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)是增殖能力最强的成体干细胞,且分化潜力明显优于骨髓间充质干细胞,具有培养简单的优点^[7-8],但脐带造血干细胞储存时间为20年,难以满足许多慢性患者的自体干细胞移植的需求。ZHANG等^[9]第一次从尿液中分离和鉴定出一种为数不多却具有强大增殖能力及某些间充质干细胞特征的细胞,称之为尿源性干细胞(human urine-derived stem cells, hUSCs),动物实验证实, hUSCs能改善肾功能、阴茎勃起功能、尿道括约肌功能以及修复肝脏功能^[10-11]。鉴于目前用于研究的干细胞来源存在伦理上的争议或者有创性方面的不足,而且通常来自健康人的捐

助,虽然同种异体间充质干细胞的抗原性相对较小,但是患者仍然可能会对来自异体的细胞产生免疫排斥反应以及发生移植相关的副作用,甚至加速病情进展。理想的种子细胞应使用来源于患者自身的干细胞,不被自身免疫系统所排斥。如果能找到一种更易获取的自体干细胞,作为细胞移植的种子细胞,将会在很大程度上避免以上不足。鉴于hUSCs在获取途径无创、自体移植无免疫排斥反应等方面的优势,且目前尚无研究将其与其他MSC的生物学特征作比较,本研究拟比较hUSCs与hUC-MSCs的生物学性状,为应用于组织工程的种子细胞寻找可靠细胞来源。

1 材料和方法

1.1 材料

人尿源性干细胞培养基: 500 mL K-SFM、375 mL DMEM、125 mL Ham F-12、含5% FBS(fetal bovine serum)、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin、15 ng/mL霍乱毒素、0.2 μg/mL氢化可的松、2.5 μg/mL转铁蛋白、2.5 ng/mL胰岛素、 0.9×10^4 mol/L腺嘌呤、2.5 ng/mL表皮生长因子, 0.25%胰蛋白酶均购自Gibco公司; CD24-FITC、CD29-PE、CD31-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD146-PE细胞表面标志物抗体、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒购自BD公司; 成骨诱导分化培养基、成脂诱导分化培养基、成软骨诱导分化培养基及阿利新蓝染液购自赛业生物科技有限公司; 4%多聚甲醛、油红O染液购自北京雷根

生物技术有限公司; PBS、1.0%茜素红染液、0.4%锥虫蓝染液、transwell小室、结晶紫染液均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞的分离培养

尿液标本来源于重庆医科大学附属儿童医院儿研所志愿者,得到了所有志愿者的同意,并签署知情同意书。配制hUSCs培养基^[9],取200 mL无菌清洁中段尿液,加入20 mL 10% FBS/DMEM,分装至50 mL离心管中,1 500 r/min离心5 min,弃上清,每管加入6 mL hUSCs培养基,吹打均匀后种入24孔板,1 mL细胞悬液/孔,置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)培养10~14天后传代至6孔板。人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)来源于重庆干细胞治疗工程技术研究中心,培养基为含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的Ham F-12完全培养基,为做比较,在锥虫蓝拒染、克隆形成、划痕及Transwell迁移实验中hUC-MSCs的培养基为含5% FBS的Ham F-12完全培养基。

1.3 干细胞表面标记物的鉴定

取第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs,制成细胞悬液(1×10⁶个/管),PBS洗2遍后每管加入5μL抗体(鼠抗人CD24-FITC、CD29-PE、CD31-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD146-PE),空白对照为不添加抗体的细胞悬液,阴性对照为FITC Mouse IgG1, k Isotype Ctrl(FC)和PE Mouse IgG1, k Isotype Ctrl(FC)室温避光孵育30 min, PBS洗涤2次后加300 μL PBS重悬,流式细胞仪上机检测。

1.4 锥虫蓝拒染实验

取对数期生长的第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs接种于12孔板,初始细胞浓度为5×10⁵个/孔,两组分别设置3个复孔,每3天换一次培养基。在0、1、2、3、4、5、6天时进行实验,细胞刚贴壁时记为0天,检测为初始细胞数。计数时将细胞制成细胞悬液,加入10.0%浓度为0.4%的锥虫蓝染液混匀,取20 μL至血球计数板,于10×物镜显微镜下观察计数板四角大方格中的细胞数,只计数活细胞(活细胞为透明,死细胞为蓝色),计算活细胞总数:活细胞数/毫升原液=(4大格细胞数之和/4)×10⁴,每孔重复计数3次以上。

1.5 克隆形成实验

取对数期生长的第3代hUSCs及第6代hUC-

MSCs消化后重悬,锥虫蓝拒染计数活细胞,于12孔板内每孔接种活细胞200个,每组3个复孔。培养14天,计数大于50个细胞的克隆数,用4%多聚甲醛固定后结晶紫染色拍照。

1.6 划痕实验

取对数期生长的第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs消化后重悬,接种于6孔板中,接种密度约为60%,细胞融合率达100%时,用1 mL的枪头垂直比着直尺进行划痕;PBS洗3次后加入新鲜培养基,分别于0、12、24 h在同一部位观察划痕愈合情况,显微镜下拍照。测量不同时间划痕宽度,计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-实验时间划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%,实验重复3次。

1.7 Transwell迁移实验

取对数期生长的第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs消化后用无血清培养基重悬,血球计数板计数后稀释细胞悬液至每100 μL含约5×10⁴个细胞,吹匀后分别取100 μL悬液加入24孔板中的transwell上室,同时下室加入500 μL含5% FBS的培养基,每组3个复孔,放入37 °C培养箱中培养48 h后吸弃上室及下室孔内培养基,PBS洗3次后下室每孔加4%多聚甲醛500 μL,室温固定30 min,PBS洗3次后下室每孔加500 μL结晶紫染液,室温孵育30 min,取出小室,用湿棉签轻拭去上室细胞,PBS洗净,显微镜下拍照。

1.8 成骨诱导及检测

第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs接种在24孔板中,接种密度约为30%,细胞贴壁后换成骨诱导培养基,3天一次换液。诱导7天后进行ALP染色:弃原培养基,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3次,加入配制好的ALP染色工作液,在37 °C孵箱孵育30 min,吸弃染液,PBS洗3次,加1 mL PBS,显微镜下拍照。成骨诱导培养基+β-磷酸甘油, Vit C诱导14天后进行茜素红染色:弃原培养基,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3次,加入1%的茜素红染液,在37 °C孵箱孵育30 min,吸弃染液,PBS洗3次,加1 mL PBS,显微镜下拍照。

1.9 成脂诱导及检测

第3代hUSCs及第6代hUC-MSCs接种在24孔板中,接种密度约为30%,细胞贴壁后换成脂诱导培养基(A培养基3天,B培养基1天交替使用)。诱导21天后进行油红O染色:弃原培养基,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3次,加入油红O染液,在

37 °C 孵箱孵育 30 min, 吸弃染液, PBS 洗 3 次, 加 1 mL PBS, 显微镜下拍照。

1.10 成软骨诱导及检测

第 3 代 hUSCs 及第 6 代 hUC-MSCs 接种在 24 孔板中, 接种密度约为 30%, 细胞贴壁后换成软骨诱导培养基, 3 天换一次液。诱导 14 天后进行阿利新蓝染色: 弃原培养基, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 加入阿利新蓝染液, 在 37 °C 孵箱孵育 30 min, 吸弃染液, PBS 洗 3 次, 加 1 mL PBS, 显微镜下拍照。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行数据分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞的形态学

正常健康人的 hUSCs 为贴壁生长细胞, 呈米粒状, 胞体较小, 排列紧密, 原代接种后 3 d 左右开始贴壁, 10~14 天达 50%~60% 融合, 即可传代。传代后细胞生长速度加快, 3~4 天细胞融合率达 80% 左右, 体外培养至 10 代, 增殖开始减慢(图 1A)。而 hUC-MSCs

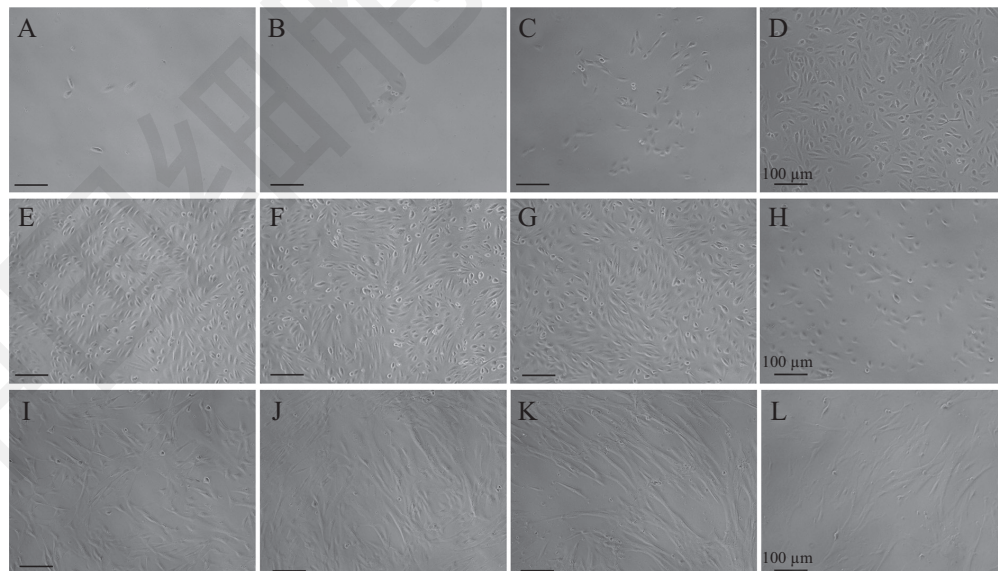
为长梭形贴壁细胞, 呈旋涡状排列生长, 传代至 20 代左右增殖明显减慢(图 1B)。

2.2 人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞的鉴定

流式结果显示, hUSCs 表达间充质干细胞表面特异性标志物 CD24、CD29、CD73、CD90、CD105, 阳性率分别为 $97.95 \pm 2.76\%$ 、 $99.90 \pm 0\%$ 、 $97.30 \pm 1.98\%$ 、 $86.05 \pm 6.29\%$ 、 $2.12 \pm 2.15\%$, 表达周期表面标志物 CD146, 阳性率为 $92.15 \pm 1.34\%$, 不表达造血细胞表面标志物 CD31、CD34、CD45(图 2A)。hUC-MSCs 表达间充质干细胞表面特异性标志物 CD24、CD29、CD73、CD90、CD105, 阳性率分别为 $10.15 \pm 2.09\%$ 、 $99.95 \pm 0.07\%$ 、 $91.55 \pm 1.34\%$ 、 $100 \pm 0\%$ 、 $96.40 \pm 1.56\%$, 表达周期表面标志物 CD146, 阳性率为 $59.30 \pm 5.8\%$, 不表达造血细胞表面标志物 CD31、CD34、CD45(图 2B), 虽然 CD 表面标志物的阳性表达率不尽相同, 但 hUSCs 及 hUC-MSCs 均具有间充质干细胞的表面特性。

2.3 细胞增殖及克隆形成

锥虫蓝据染试验绘制活细胞生长曲线, 结果显示: hUSCs 和 hUC-MSCs 均呈对数增长曲线, hUC-MSCs 增殖能力更强 ($P < 0.05$) (图 3A); 克隆形成试验发现: hUSCs 克隆形成能力较强每个克隆分界清楚,

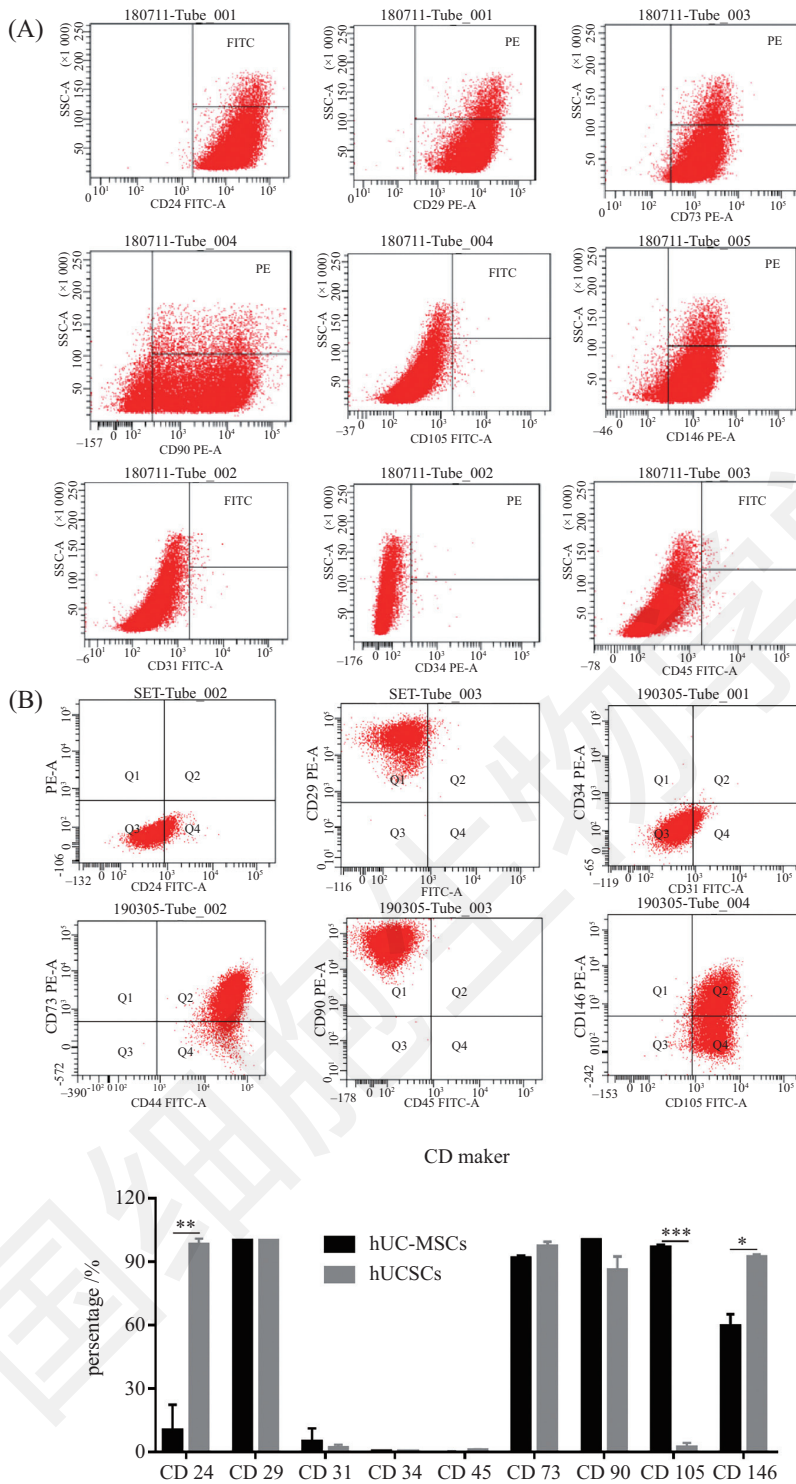


不同天数(A、B、C、D分别代表3、5、7、9 d)及不同代数(E、F、G、H分别代表P3、P5、P7、P10)的原代人尿源性干细胞形态; 不同代数(I、J、K、L分别代表P3、P6、P9、P30)的人脐带间充质干细胞形态。

The morphology of hUSCs in different days (A,B,C and D represent 3, 5, 7, and 9 days, respectively) and different passages (E,F,G, and H represent P3, P5, P7, and P10, respectively); the morphology of hUC-MSCs in different passages (I,J,K and L represent P3, P6, P9, and P30, respectively).

图1 细胞形态学

Fig.1 Cell morphology



A: 人尿源性干细胞; B: 人脐带间充质干细胞。流式细胞计数显示人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞均表达大多数干细胞标志物。

A: hUSCs; B: hUC-MSCs。Flow cytometry shows that both hUSCs and hUC-MSCs express most stem cell markers.

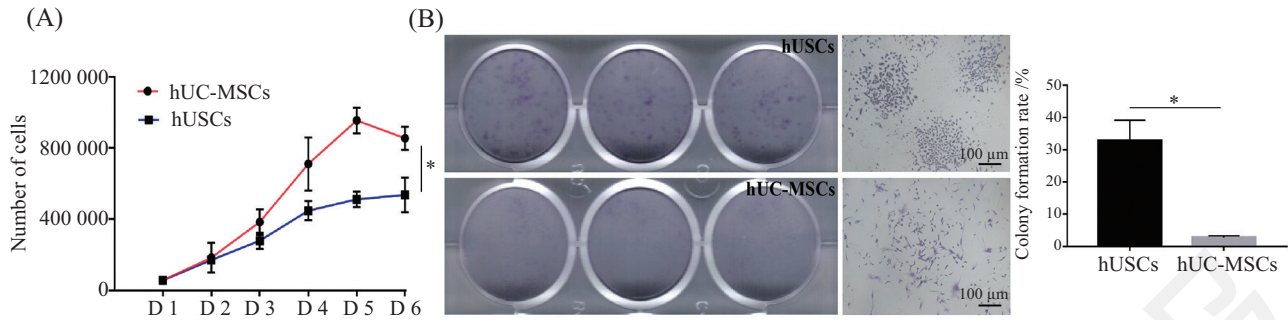
图2 流式细胞学检测人尿源性干细胞及人脐带间充质干细胞的表面标志物

Fig.2 Different CD surface markers of hUSCs and hUC-MSCs were detected by flow cytometry

克隆形成率为 $32.67 \pm 6.43\%$, 而hUC-MSCs几乎不成克隆方式增殖, 克隆形成率为 $2.67 \pm 0.58\%$, 细胞大多呈散在生长(图3B), 提示hUSCs的克隆形成能力优于hUC-MSCs。

2.4 迁移能力

如图4所示, 划痕实验结果显示: hUC-MSCs较hUSCs水平迁移能力更强($P < 0.05$), 划痕愈合率在12 h已达到 $(54.31 \pm 2.02)\%$, 24 h几乎完全愈合,

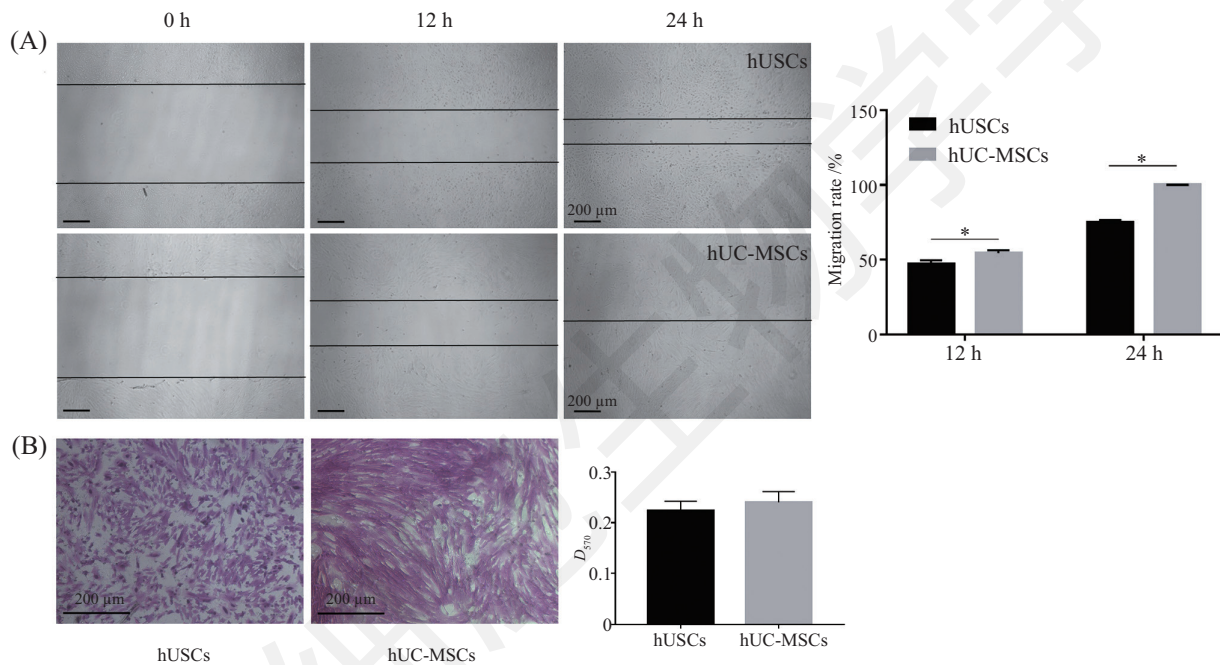


A: 锥虫蓝拒染实验绘制细胞增殖曲线; B: 克隆形成结晶紫染色。* $P < 0.05$ 。

A: trypan blue rejection test to draw cell proliferation curve; B: crystal violet staining of colony formation. * $P < 0.05$ 。

图3 细胞增殖及克隆形成率

Fig.3 Cell proliferation and colony formation rate



A: 划痕实验, * $P < 0.05$; B: Transwell迁移实验。

A: wound-healing assay, * $P < 0.05$; B: transwell migration assay.

图4 划痕实验及transwell检测细胞迁移

Fig.4 Cell migration ability was detected by would healing assay and transwell assay

Transwell迁移实验结果趋势一致, 但无统计学意义。

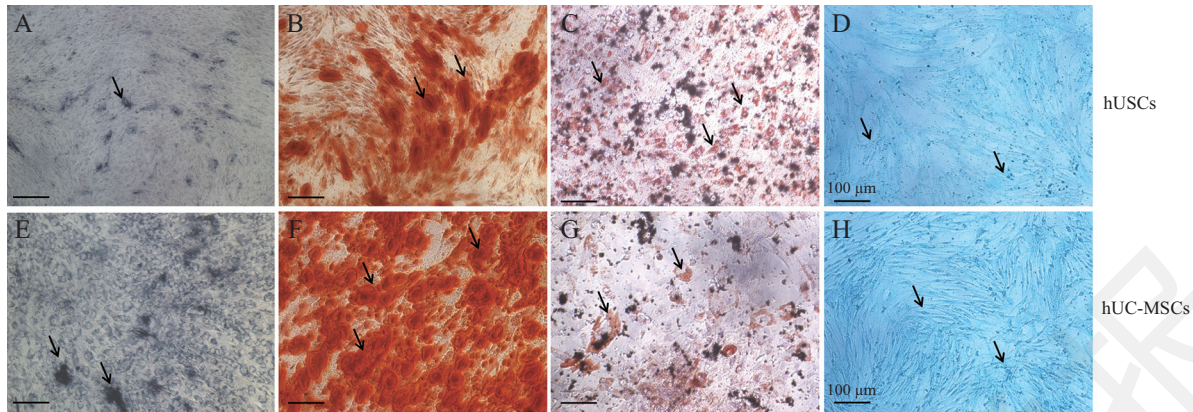
2.5 多向分化潜能

经成骨诱导7天后, ALP染色阳性细胞胞质成蓝紫色, 核外围较深染, 10%~20%的hUSCs及20%~30%的hUC-MSCs细胞染色阳性; 成骨诱导14天后茜素红染色阳性细胞呈红色, 钙结节呈红色团块, 50%~60%的hUSCs及80%~90%的hUC-MSCs细胞染色阳性。提示hUSCs的成骨分化的能力稍弱于hUC-MSCs。成脂诱导21天后, 油红O染色阳性细胞呈空泡样、脂肪样变、红染, 部分细胞可见较多脂滴,

50%~60%的hUSCs及20%~30%的hUC-MSCs细胞染色阳性, 提示hUSCs具有成脂分化的能力, 且比hUC-MSCs成脂能力更强。成软骨诱导14天后, 两组中几乎所有细胞阿利新蓝染色均呈阳性, 胞质及胞膜均呈蓝色, 但hUC-MSCs染色更深。hUSCs细胞形态改变, 由原来的米粒状变成与hUC-MSCs类似的长梭形且呈旋涡状排列生长(图5)。

3 讨论

干细胞已被证实具有强大的分化潜能、自我更新能力、免疫调节作用以及靶向治疗功能, 是细胞



处理7天后的ALP染色(A、E), 处理14天后的茜素红染色(B、F), 处理21天后的油红O染色(C、G)及处理14天后的阿利新蓝染色(D、H)(A、B、C、D代表hUSCs; E、F、G、H, 代表hUC-MSCs)。箭头表示染色阳性颗粒。

ALP staining after 7 days of treatment (A,E), alizarin red staining after 14 days of treatment (B,F), oil red O staining after 21 days of treatment (C,G) and alcian blue staining after 14 days of treatment (D,H) (A,B,C and D represent hUSCs; E,F,G and H represent hUC-MSCs). Arrows indicate stained positive particles.

图5 ALP染色、茜素红染色、油红O染色及阿利新蓝染色检测细胞分化

Fig.5 Cell differentiation ability was evaluated by ALP staining, alizarin red staining, oil red O staining and alcian blue staining

移植的重要种子细胞来源。骨髓、脂肪、羊水、胚胎等来源的干细胞能够作为细胞移植治疗的可选来源,但其来源存在伦理上的争议或者有创性方面的不足,以及异体移植的免疫排斥反应。hUC-MSCs来源于胎儿出生后的生物废弃物,现已广泛应用于各种再生医学和组织工程方面,并且已经从基础研究逐步应用于临床治疗^[12],脐带来源的MSCs被认为对T细胞、B细胞和NK细胞具有比BMSCs更好的免疫抑制作用^[13-16],且脐带间充质干细胞在细胞增殖能力及成骨分化潜力方面都明显较骨髓间充质干细胞强。因此本研究以hUC-MSCs为对照,比较了hUSCs的生物学性状。

首先,我们通过细胞表面标志物表达证明了hUSCs与hUC-MSCs有相似的免疫表型。然而,CD24在hUSCs高表达而在hUC-MSCs表达较低,CD105在不同人的hUSCs大多为低表达^[17-18]而在hUC-MSCs高表达,焦洁等^[19]发现,在上皮性卵巢癌细胞系3AO中CD24⁻细胞比CD24⁺细胞具有更强的增殖能力,也可解释本研究中相对低表达CD24的hUC-MSCs增殖能力优于hUSCs。HARVANOVÁ等^[20]报道,滑液和滑膜中的CD105⁺细胞与CD105⁻细胞相比可以获得更好的分化能力,我们也发现,与hUC-MSCs相比,hUSCs仅表现出中度的成骨分化能力及成软骨潜力。MURAGLIA等^[21]提出分化层次模型,随着早期MSC逐渐成熟,首先失去其脂肪形成能力,进一步成熟逐渐失去软骨形成功能,但保留了成骨

能力,可解释本研究中脂肪细胞分化在hUC-MSCs稍弱的现象。2006年,国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)提出了判定MSC的最低标准和通用标志物^[22],认为体外扩增的人MSC表达细胞表面标志物CD73、CD105和CD90,缺乏内皮细胞和造血干细胞标志物CD34、CD31和CD45^[22]。但不同来源的MSC分子标志物表达有所差异,有研究认为,牙周膜源MSC的CD90表达量较其他分子多,而脂肪源MSC的CD105表达量相对多。我们认为,与其他MSC相比CD105在hUSCs的低表达可能与组织来源有关。

本课题组既往检测了2~80岁的200例以上正常人的尿液样本,几乎所有尿液样本都能培养出hUSCs,尿源性干细胞的增殖能力在不同个体及同一个体不同批次的尿液样本中有差异,但无明显统计学意义,如青壮年的hUSCs普遍比老年人能传代次数更多,同一个人不同时间收集的hUSCs也存在传代及增殖的差异,hUSCs的细胞状态可能与个体差异及收集尿液时供体的身体状况有关,但总的来说,每一个人都能获得状态良好的hUSCs。hUSCs的生长动力学较hUC-MSCs稍差,但其克隆形成能力较hUC-MSCs更好,增殖率不能作为细胞移植优势的唯一标准,且hUSCs可多次从同一供体获得,可提供稳定的细胞数量,在自体移植中具有较大优势。hUSCs具有较高端粒酶活性,能保持约达68次群体倍增,收集一次尿液(约200mL)所得到的平均约为14

个USCs, 培养4周后可在第五代产生 5.3×10^9 个细胞, 如收集24 h尿液, 所得细胞数足够临床应用^[23]。由于细胞迁移被认为是MSCs在组织修复中诱导的生理效应背后的机制之一, 因此必须了解它们迁移到受损组织的能力。hUC-MSCs显示出相对于hUSCs更高的迁移潜力, 其在24 h内划痕达到完全愈合, 但hUSCs在24 h也达到了75%左右的愈合率。总的来说, 本研究发现hUC-MSCs在增殖、迁移及分化潜能方面都较hUSCs有明显的优势, 这也与前人的研究结果相似, 许多研究认为, hUC-MSCs增殖能力明显强于骨髓等组织来源的MSC, 且较BMSCs有更强的分化潜能^[24-26], 在黏附和迁移能力对比上hUC-MSCs较人BM-MSC和来自小梁骨的MSC要强, 且较不易扩散^[27]。

hUSCs已被广泛用于组织工程的研究, 不同模型动物实验证实hUSCs经旁分泌作用, 能改善肾功能、阴茎勃起功能、尿道括约肌功能以及修复肝脏功能^[17,28-30]。本研究结果显示, hUSCs与hUC-MSCs相似, 有较强的间充质干细胞特性, 表达多种间充质干细胞表面标志物; 具备良好的体外生长能力, 及良好的多向分化潜能, 且用于自体移植可避免免疫排斥反应。因此基于免疫原性等方面综合考虑, 我们认为, 骨及软骨组织相关的组织工程可以优先选择BMSCs, 大多数异体移植可以优先选择hUC-MSCs, 而自体移植则可以优先选择hUSCs。综上所述, 通过无创伤方法获取的尿源性干细胞可作为组织工程中的一种理想种子细胞来源。

参考文献 (References)

- [1] NAGAMURA-INOUE T, HE H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(2): 195-202.
- [2] GEBLER A, ZABEL O, SELIGER B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(2): 128-34.
- [3] STAGG J, GALIPEAU J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(5): 856-67.
- [4] LV LX, ZHANG XF, WANG YY, et al. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells *in vitro* and bone regeneration *in vivo* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(2): 319-30.
- [5] MA J, YANG F, BOTH S K, et al. *In vitro* and *in vivo* angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures [J]. *Biofabrication*, 2014, 6(1): 015005.
- [6] ALMUBARAK S, NETHERCOTT H, FREEBERG M, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration [J]. *Bone*, 2016, 83: 197-209.
- [7] ROMANOV Y A, SVINTSITSKAYA V A, SMIRNOV V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 105-10.
- [8] BAKSH D, YAO R, TUAN R S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1384-92.
- [9] ZHANG Y, MCNEILL E, TIAN H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction [J]. *J Urol*, 2008, 180(5): 2226-33.
- [10] BHARADWAJ S, LIU G, SHI Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1840-56.
- [11] BHARADWAJ S, LIU G, SHI Y, et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15/16): 2123-32.
- [12] BATSALI A K, KASTRINAKI M C, PAPADAKI H A, et al. Mesenchymal stem cells derived from wharton's jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8(2): 144-55.
- [13] NAJAR M, RAICEVIC G, BOUFKER H I, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources [J]. *Cell Immunol*, 2010, 264(2): 171-9.
- [14] LI X, BAI J, JI X, et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(3): 695-704.
- [15] YOO K H, JANG I K, LEE M W, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues [J]. *Cell Immunol*, 2009, 259(2): 150-6.
- [16] RIBEIRO A, LARANJEIRA P, MENDES S, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5): 125.
- [17] 胡超群, 方姝煜, 龚梦嘉, 等. 尿源性干细胞移植修复慢性肝损伤裸鼠肝脏功能[J]. *中国细胞生物学学报*(HU C Q, FANG S Y, GONG M J, et al. Urine-derived stem cells repair liver function in nude mice with chronic liver injury. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(5): 851-8
- [18] 陶立, 马文军, 龚梦嘉, 等. 糖尿病肾病患者尿源性干细胞的分离鉴定及与健康人尿源性干细胞的细胞生物学比较研究[J]. *中国细胞生物学学报*(TAO L, MA W J, GONG M J, et al. Isolation and identification of urine derived stem cells from patients with diabetic nephropathy and comparison with urine derived stem cells from healthy people in biological. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(2): 194-201
- [19] 焦洁. 人卵巢癌CD24⁺表型细胞的干细胞特征及上皮-间质转变的体外研究[J]. *浙江大学*(JIAO J. The study on stem cell characteristics and EMT of CD24⁺ human ovarian carcinoma cells *in vitro*. Zhejiang University), 2011.

- [20] HARVANOVÁ D, TÓTHOVÁ T, SARIŠSKÝ M, et al. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells [J]. *Folia Biol*, 2011, 57(3): 119-24.
- [21] MURAGLIA A, CANCEDDA R, QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(7): 1161-6.
- [22] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-7.
- [23] ALCAYAGA-MIRANDA F, CUENCA J, LUZ-CRAWFORD P, ET AL. Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 32.
- [24] VASILJEVIĆ B, MAGLAJLIĆ-DJUKIĆ S, GOJNIĆ M. THE prognostic value of amplitude-integrated electroencephalography in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2012, 69(6): 492-9.
- [25] VERKLAN MT. The chilling details hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *J Perinat Neonatal Nurs*, 2009, 23(1): 59-68.
- [26] 禹亚彬, 顾殿华. 人脐带间充质干细胞与骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的比较[J]. *中华肝胆外科杂志* (YU Y B, GU D H. Comparison of the hepatic differentiation potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells with bone marrow mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*), 2016, 22 (1): 13-6.
- [27] ALANAZI A, MUNIR H, ALASSIRI M, et al. Comparative adhesive and migratory properties of mesenchymal stem cells from different tissues [J]. *Biorheology*, 2019, 56(1): 1-16.
- [28] OUYANG B, SUN X, HAN D, et al. Human urine-derived stem cells alone or genetically-modified with FGF2 improve type 2 diabetic erectile dysfunction in a rat model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92825.
- [29] LANG R, LIU G, SHI Y, et al. Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53980.
- [30] BODIN A, BHARADWAJ S, WU S, et al. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(34): 8889-901.