

研究论文

人羊水来源干细胞与骨髓间充质干细胞的对比研究

王泽莹¹ 张成龙¹ 沈洪洲¹ 司家文^{1*} 史俊¹ 沈国芳^{1,2*}

(¹上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; ²上海健康医学院, 上海 201318)

摘要 该研究对比人羊水来源干细胞(human amniotic fluid derived stem cells, hAFSCs)和人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs)的细胞表型及成骨分化能力。分离培养hAFSCs和hBMSCs, 通过光镜观察, CCK-8检测, 流式细胞术, 基因芯片等方法对比两组细胞表型, 采用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色, 茜素红(alizarin red S, ARS)染色, Real-time PCR, 细胞免疫荧光等方法对比两组细胞体外成骨分化过程, 再进一步通过裸鼠异位成骨来初步检测两种细胞体内成骨能力。结果显示, hAFSCs与hBMSCs在镜下均表现为梭形, 且具有相似的增殖能力, 都表达CD90和CD105, 成骨诱导下两种细胞ALP活性及矿化结节均随着时间增加, 同时成骨标志物RUNX2、OSX、COL I、ALP、OPN的mRNA水平也增高。基因芯片分析表明, 两者在细胞黏附以及炎症反应方面的基因表达存在差异。类似地, 体内裸鼠异位成骨结果也表明, hAFSCs与hBMSCs具有相近的成骨分化潜能。总之, 人羊水来源干细胞与人骨髓间充质干细胞具有相似的细胞形态及增殖能力, 均能在体内外成骨诱导分化环境下展现出良好的成骨功能。

关键词 人羊水来源干细胞; 人骨髓间充质干细胞; 细胞表型; 成骨分化

Comparative Study of Human Amniotic Fluid Derived Stem Cells and Bone Marrow Mesenchymal Cells

WANG Zeying¹, ZHANG Chenglong¹, SHEN Hongzhou¹, SI Jiawen^{1*}, SHI Jun¹, SHEN Guofang^{1,2*}

(¹Department of Oral and Craniomaxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; ²Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract This work was to study the phenotype and osteogenic differentiation potential of hAFSCs (human amniotic fluid derived stem cells) and hBMSCs (human bone marrow mesenchymal stem cells). hAFSCs and hBMSCs were separated and cultured *in vitro*. Cellular phenotype was compared by light microscope, CCK-8 assessment, flow cytometry and gene-chip analysis. Then, the osteogenic capability of both cells was assessed with ALP (alkaline phosphatase) and ARS (alizarin red S) staining, Real-time PCR and cytoimmunofluorescence staining. Furthermore, an ectopic osteogenic model of nude mice was used for estimating the *in vivo* osteogenesis capacity of both cells. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software package. Both hAFSCs and hBMSCs showed spread

收稿日期: 2020-11-26

接受日期: 2021-04-19

国家自然科学基金(批准号: 81600827、81570947、81771036)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13122091691, E-mail: sjwyl@163.com; Tel: 021-65882507, E-mail: shengf@sumhs.edu.cn

Received: November 26, 2020

Accepted: April 19, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81600827, 81570947, 81771036)

*Corresponding authors. Tel: +86-13122091691, E-mail: sjwyl@163.com; Tel: +86-21-65882507, E-mail: shengf@sumhs.edu.cn

spindle-like morphology, similar proliferation, and expression of CD90, CD105. ALP and ARS staining indicated the progressively increased ALP activity and mineralization under osteogenic induction, while the mRNA expression of *RUNX2*, *OSX*, *COL1*, *ALP*, *OPN* were also increased. Gene chip analysis indicated that there were differences in gene expression between hAFSCs and hBMSCs in terms of cell adhesion and inflammation. The *in vivo* study in nude mice demonstrated that hAFSCs and hBMSCs possessed similar differentiation potential of osteogenesis. In conclusion, hAFSCs and hBMSCs demonstrated similar morphology, proliferation and capacity of osteogenesis.

Keywords human amniotic fluid derived stem cells; human bone marrow mesenchymal stem cells; cell phenotype; osteogenic differentiation

随着口腔再生医学的发展,尤其是在干细胞和组织工程方面,干细胞已作为种子细胞^[1],被应用于颌面外科创伤^[2]、先天畸形^[2-3]、手术后功能重建^[4]等领域。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)已经被成功从体内分离,并有大量体内体外实验证明其可以用作骨组织工程的干细胞来源^[5-9]。其中在骨愈合过程中发挥着重要作用的人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs)的研究已被广泛探索。然而,骨髓间充质干细胞亦有其缺点,如获取时对组织形成创伤、细胞容易衰老、获取时数量有限等^[10],这些都阻碍了间质细胞在远期临床当中的应用,促使我们去寻找更加适合的种子细胞。1983年,GOSDEN^[11]在羊膜穿刺液中发现大量的干细胞,并将其命名为羊膜来源干细胞(human amniotic fluid derived stem cells, hAFSCs),其为介于胚胎干细胞和成体干细胞间的细胞群,并表达胚胎干细胞和成体细胞的标志物。hAFSCs具有多向分化潜能,可分化为内、中、外三胚层细胞,并且其体外扩增无需滋养层细胞的参与,扩增不具有成瘤性^[12]。目前,hAFSCs的培养多利用其贴壁的特点,将穿刺获取的羊水离心后获取的细胞接种于适当的培养基中,例如 α -MEM培养基即可成功培养出羊水干细胞^[13]。胚胎干细胞具有全能性,可以通过诱导获得任何一种细胞,类似地,hAFSCs亦能通过精准的诱导分化获得相应的细胞,从而作为种子细胞治疗相关疾病。TSAI等^[14]对获得的羊水干细胞在特殊条件下进行培养,1~3周诱导分化成为脂肪细胞、骨细胞和具有神经细胞特性的细胞。ANTONUCCI等^[15]将hAFSCs进行成骨诱导,发现相应成骨诱导标志物有明显提升,提示hAFSCs可作为骨缺损修复的细胞来源。BERARDINELLI等^[16]对羊AFSCs-富含Mg的羟磷灰石支架复合物行体外骨向诱导分化培养并应用于上颌窦提升,结果显示

AFSCs增加了术区骨量沉积、加快了新生血管生成。

基于这些发现,我们分别分离出人骨髓间充质干细胞和人羊水来源干细胞,对两种细胞的形态学、增殖能力、体内体外骨向分化潜能进行了对比研究,以期能够为羊水来源干细胞应用于口腔颌面部骨缺损的修复提供证据。

1 材料与方法

1.1 细胞分离与培养

经日常产前诊断为目的的超声引导下羊膜穿刺术获得产妇羊水,妊娠期为18~22周不等。在需要牙槽突裂自体骨移植的患者中获取部分骨髓。材料获取征得所有受试者的书面同意并获得上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理审查批准,并且所有受试者血液检查无异常。hBMSCs和hAFSCs按照文献方法分离^[12-13,17-20],分离后扩增培养至第二代备用。培养基配方:DMEM/F12培养基(Invitrogen, 中国)、2 mmol/L谷氨酰胺(Invitrogen, 中国)、10 ng/mL重组人表皮生长因子(Invitrogen, 中国)、20%胎牛血清(Gibco, 中国)和1%青链霉素(Invitrogen, 中国),其中羊水来源干细胞培养基中添加重组人成纤维生长因子。所有细胞均于含5% CO₂的37℃温箱内培养,每2天换液一次。

1.2 细胞形态及增殖的体外比较

将传代扩增后的hBMSCs和hAFSCs培养于24孔板中,并分别将hBMSCs和hAFSCs以低密度(1×10^3 个/mL)培养于96孔板中,每孔加入DMEM/F12完全培养液,培养4 h、2、4、6、8、10、12天。在每个时间点,按照说明书使用CCK-8(Dojindo, 日本)测定细胞增殖情况。

1.3 流式细胞术

取细胞密度长至50%的hBMSCs和hAFSCs,胰酶(Invitrogen, 中国)消化,使用含有0.5%胎牛血清的PBS漂洗,获得细胞。为检测细胞表面基础标志

物的表达, 将 1×10^6 个/mL hBMSCs和hAFSCs使用分别标记有藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(Miltenyi, 德国)的一抗在 4°C 下孵育30 min, 包括: PE-CD90、PE-CD105、FITC-CD34、FITC-CD45、PE-HLA-dr^[21]。非特异性荧光使用同种匹配的单克隆抗体封闭。实验结果使用装备FlowCentre workstation (Beckman Coulter, 美国)的Beckman Coulter EPICS XL cytometer (Beckman Coulter, 美国)分析。

1.4 基因芯片检测

分别取3组生长至70%的hBMSCs和hAFSCs, 加入RNAiso Plus试剂(TaKaRa, 日本)提取获得总RNA, 样品总RNA利用NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)定量并检测RNA完整性后, 经反转录并用Cy3(Cyanine-3-CTP)标记后使用Affymetrix human HTA2.0 microarray (Affymetrix, USA)芯片进行样本检测, 并对数据进行标准化和过滤处理分析。利用 t 检验的 P 值和倍数变化值进行差异基因筛选, 筛选的标准为上调或者下调倍数变化值 $P \geq 3.0$ 且 $P \leq 0.05$ 。接着, 对差异基因进行GO和KEGG富集分析, 以判定差异基因主要影响的生物学功能或者通路。最后, 对差异基因进行非监督层次聚类分析, 利用热图的形式展示差异基因在不同样本间的表达模式。

1.5 体外成骨诱导

使用经典的成骨诱导配方: α -MEM(Invitrogen, 中国)添加10%胎牛血清(Gibico, 中国)、0.1 mmol/L 维生素C(Sigma-Aldrich, 美国)、10 mmol/L β 甘油磷酸盐(Sigma-Aldrich, 美国)、 10^{-5} mmol/L地塞米松(Sigma-Aldrich, 美国)。每3天换液一次, 21天实验终止。使用正常培养基培养细胞作为对照组。

1.5.1 碱性磷酸酶(ALP)染色 于成骨诱导第5天和第10天, 常温下使用4%多聚甲醛固定细胞, 再用PBS漂洗两次。根据说明书使用ALP染色试剂盒(Beyotime, 中国)染色, 并用PBS终止。

1.5.2 茜素红(ARS)染色 利用茜素红染色来对每组于21天时细胞外钙盐的沉积量进行评价。室温下使用4%多聚甲醛对细胞固定20 min, 去离子水漂洗两次。茜素红(40 mmol/L, pH4.2; Sigma-Aldrich, 美国)染色15 min, 去离子水漂洗终止。

1.5.3 Real-time PCR 分别收集成骨诱导后0、3、7、10天的诱导组和对照组hBMSCs和hAFSCs, 加入RNAiso Plus试剂(TaKaRa, 日本)提取获得总RNA,

再取同等剂量的RNA使用PrimeScript RT-PCR试剂盒(TaKaRa, 日本)逆转录为cDNA^[22]。利用SYBR Premix Ex Taq反应体系(TaKaRa, 日本)及Real-time PCR仪器(ABI 7300, 美国)分别测定各个时间点的*RUNX2*、*OSX* (osterix)、*COL I* (collagen I)、*ALP*、*OPN* (osteopontin)和内参基因*GAPDH*的表达。

1.5.4 细胞免疫荧光 将培养于正常培养基和成骨诱导培养基的hBMSCs和hAFSCs于第10天使用4%多聚甲醛固定, 5%胎牛血清封闭, 分别使用兔抗人OPN抗体(1:100, Proteintech Group, 美国)和鼠抗人Runx2抗体(1:100, ProSci Incorporated, 美国)孵育过夜, 漂洗, 再分别使用Cy3标记的羊抗兔IgG(1:1 000, Beyotime, 中国)和FITC标记的羊抗鼠IgG(1:1 000, Beyotime, 中国), 孵育完成后再使用DAPI(1:5 000, Beyotime, 中国), 在荧光显微镜下观察。

1.6 体内成骨能力检测

1.6.1 细胞支架结构的建立 将hAFSCs和hBMSCs在成骨诱导培养基中培养7天, 然后分别取 1×10^5 个细胞接种在直径5 mm、高度10 mm的 β -磷酸三钙(β -TCP, 中国科学院上海陶瓷研究所)支架上^[23-24], 不植入细胞的 β -TCP支架材料作为对照组。

1.6.2 裸鼠异位成骨 动物实验已获得上海交通大学医学院附属第九人民医院动物实验伦理委员会的批准([2016]42)。相应地, 取9只5周龄雌性裸鼠, 随机分为3组, 每组3只, 在每只麻醉的裸鼠上形成4个背侧皮下袋, 用于置入以下3组支架构建体: β -TCP支架构建体、 β -TCP/hAFSCs构建体和 β -TCP/hBMSCs构建体^[25]。

1.6.3 组织学分析 术后4周, 于深麻醉下处死裸鼠。取材后于4%多聚甲醛固定, 脱钙, 石蜡包埋后切片, 部分切片行HE染色。免疫组化部分, 分别使用OCN(1:1 00, Santa Cruz, 美国)和CD68(1:100, AbD Serotec, 美国)进行免疫组织化学染色。

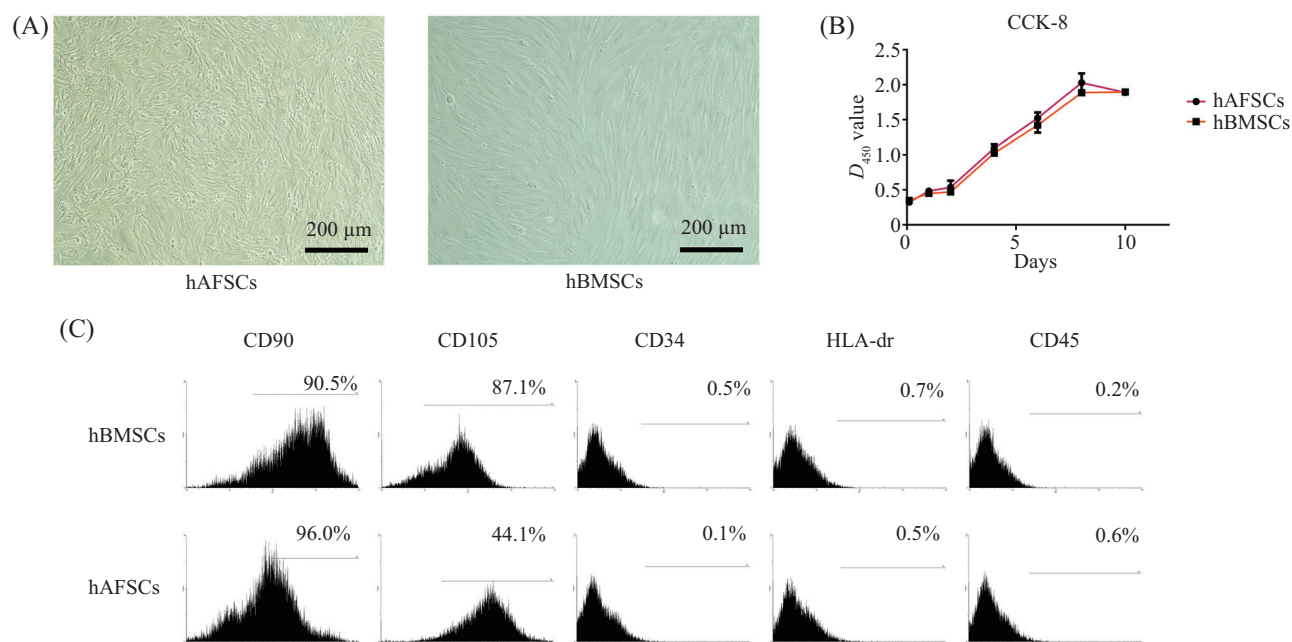
1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0软件(SPSS, 美国)对实验组和对照组数据进行 t 检验和双因子方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 hAFSCs展现出与hBMSCs相似的表型

原代培养的hBMSCs和hAFSCs大约需9~10天长满, 经传代后, hBMSCs和hAFSCs都呈现出成梭形



A: hAFSCs与hBMSCs的在光镜观下均呈现出梭形细胞形态; B: hAFSCs与hBMSCs细胞增殖情况; C: hAFSCs与hBMSCs的流式细胞分析。

A: both hAFSCs and hBMSCs showing spindle-like morphology under optical microscope; B: proliferation analysis of hAFSCs and hBMSCs; C: Flow cytometric analysis of hAFSCs and hBMSCs.

图1 hAFSCs展现出与hBMSCs相似的表型

Fig.1 hAFSCs and hBMSCs showing similar cell phenotype

的细胞形态(图1A)。采用CCK-8试剂盒测定hBMSCs和hAFSCs增殖状况,两种细胞在细胞培养的0、1、2、4、6、8、10和12天并没有表现出明显的差异(图1B)。流式细胞术检测细胞表面标志物的结果表明,两种细胞均表达间充质干细胞的表面标志物如CD90、CD105,而不表达造血干细胞的表面标志物CD34、CD45及人类白细胞抗原基因 $HLA-dr^{[12]}$ (图1C)。基因芯片聚类分析显示,6组样本被分为hAFSCs和hBMSCs两簇,两者差异表达了263个基因,其中相较hBMSCs, hAFSCs高表达基因166个,低表达基因97个(图2A)。对差异表达的基因进行GO分析显示,相较于hBMSCs, hAFSCs在肝素结合(heparin binding)、胶原结合(collagen binding)与胞外基质黏附(extracellular adhesion)上低表达(图2B、图2E和图2H),但在肌动蛋白结合(actin binding)、细胞外分泌体(extracellular exosome)上高表达(图2C、图2E和图2I)。KEGG分析显示, hAFSCs相较于hBMSCs在细胞黏附上既有基因的下调也有上调,并且与炎症相关的PI3K-Akt信号通路是下调的(图2D和图2G)。

2.2 hAFSCs与hBMSCs成骨分化染色的比较

针对于Runx2和OPN的免疫荧光结果显示,成骨诱导促进了两种细胞Runx2和OPN的高表达(图3A和

图3B)。此外,两种细胞ALP及ARS染色结果表明,成骨诱导之后ALP活性及矿化结节的形成均随时间逐步增加,且在成骨诱导的第21天hAFSCs的钙盐沉积显著高于hBMSCs组(图3C和图3D)。

2.3 Real-time PCR结果

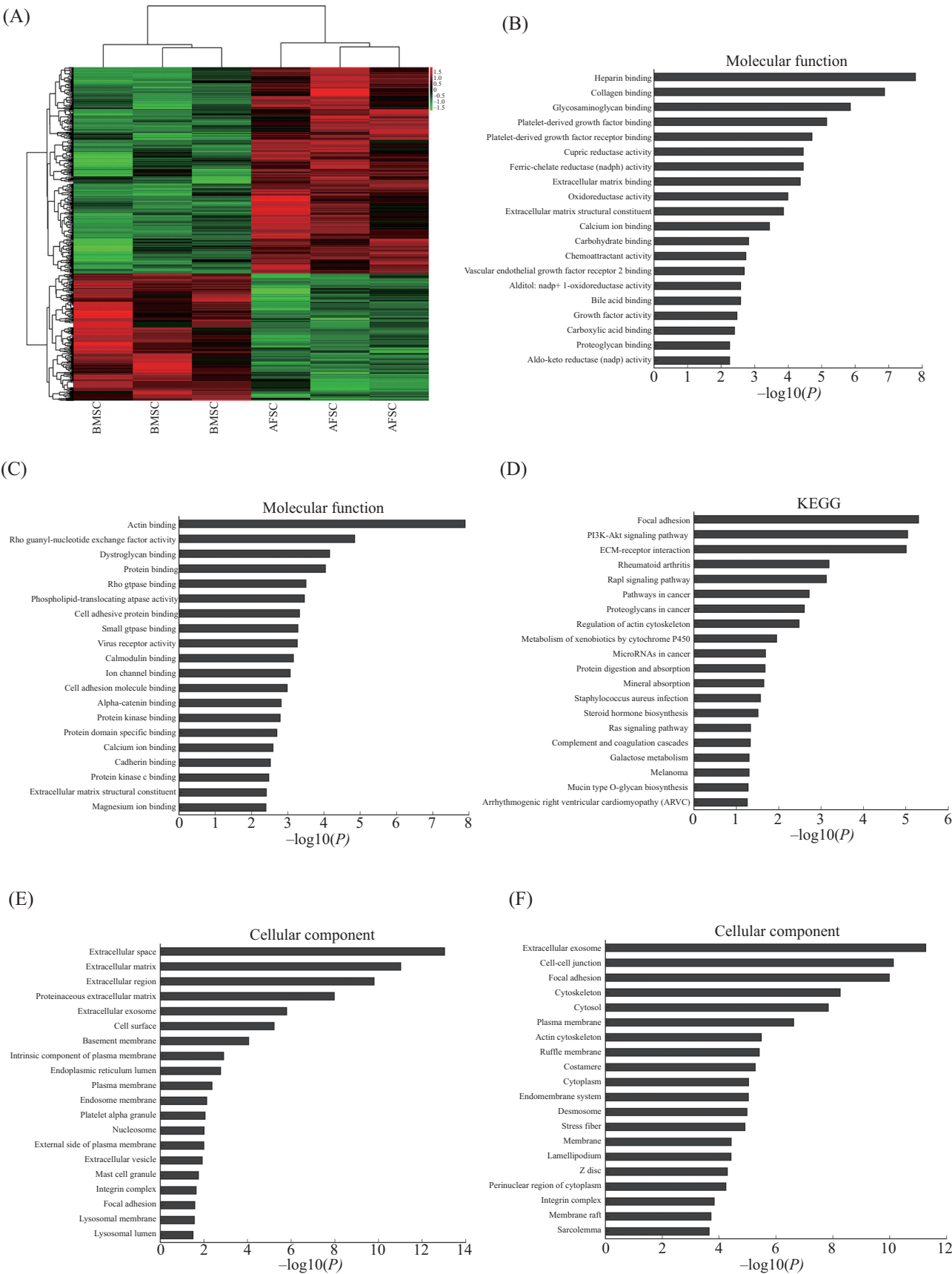
结果显示,在体外成骨向诱导的3、7、10天后,成骨诱导组hBMSCs和hAFSCs相对于未诱导对照组细胞 $RUNX2$ 、 OSX 、 $COL 1$ 、 ALP 、 OPN 表达均显著提高,仅仅在第10天hBMSCs细胞中 $RUNX2$ 及 OSX 的表达没有表现出统计学差异(图4)。

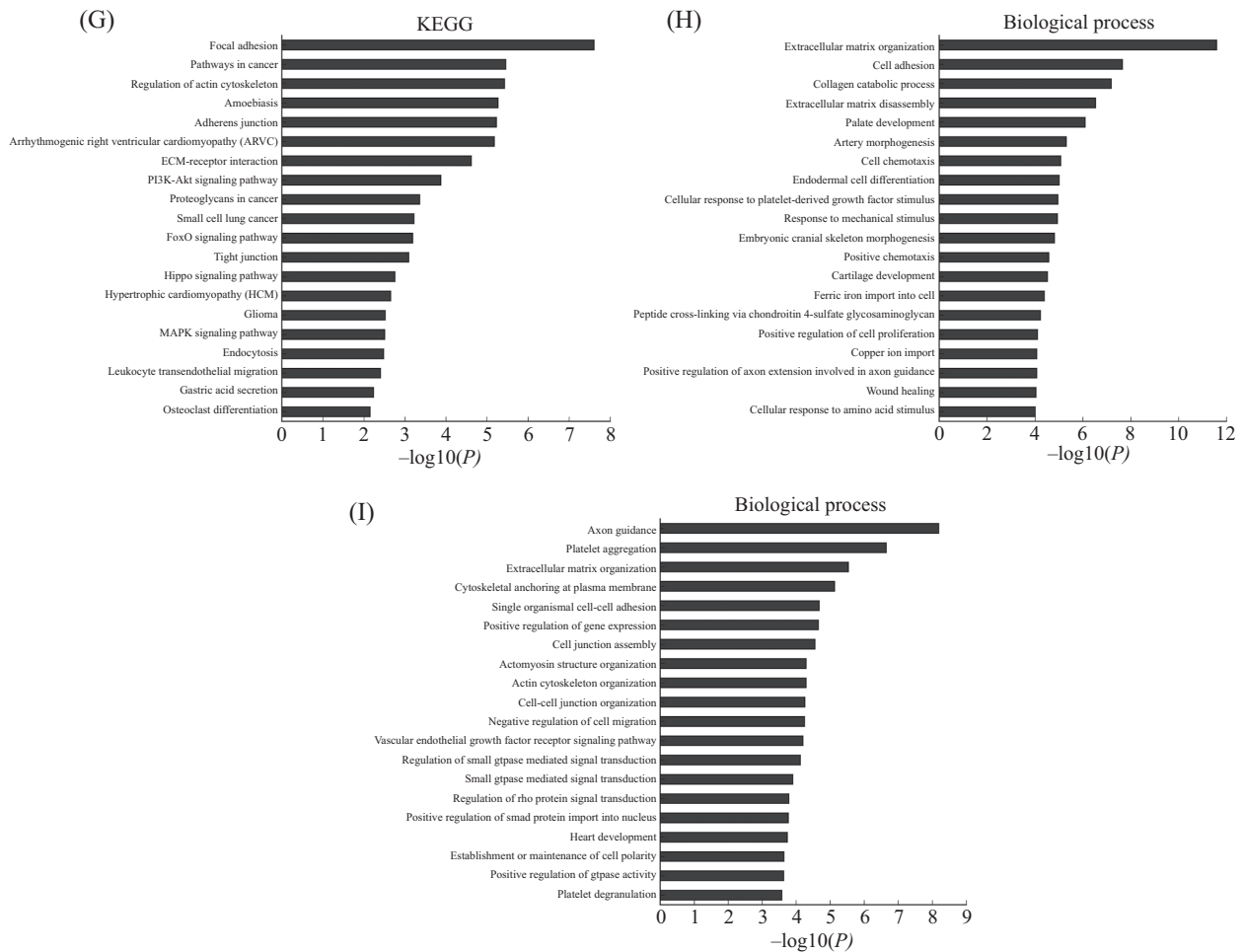
2.4 裸鼠异位成骨结果

在接种包含有hBMSCs及hAFSCs的支架材料4周之后,取出材料,尽管在HE染色中,实验组和 β -TCP对照组均没有显示出良好的矿化区(图5B、图5F和图5J),但是免疫组化染色的结果显示, hBMSCs和hAFSCs实验组材料周围的CD68阳性巨噬细胞少于对照组(图5C、图5G和图5K),而OCN阳性细胞均较对照组高(图5D、图5H和图5L),表明两种细胞均具有成骨潜能。

3 讨论

近年来,干细胞技术在多个领域展现出广阔的应





A: 差异基因热图; B、E、H及C、F、I: 下调及上调的差异基因GO富集; D、G: 下调及上调的差异基因KEGG通路功能, hAFSCs与hBMSCs对比。
A: heatmap among differential genes; B,E,H and C,F,I: down-regulated and up-regulated differential genes of GO enrichment; D,G: down-regulated and up-regulated differential genes of KEGG pathway function, hAFSCs vs hBMSCs.

图2 hAFSCs与hBMSCs的GO和KEGG分析
Fig.2 Analysis of GO and KEGG between hAFSCs and hBMSCs

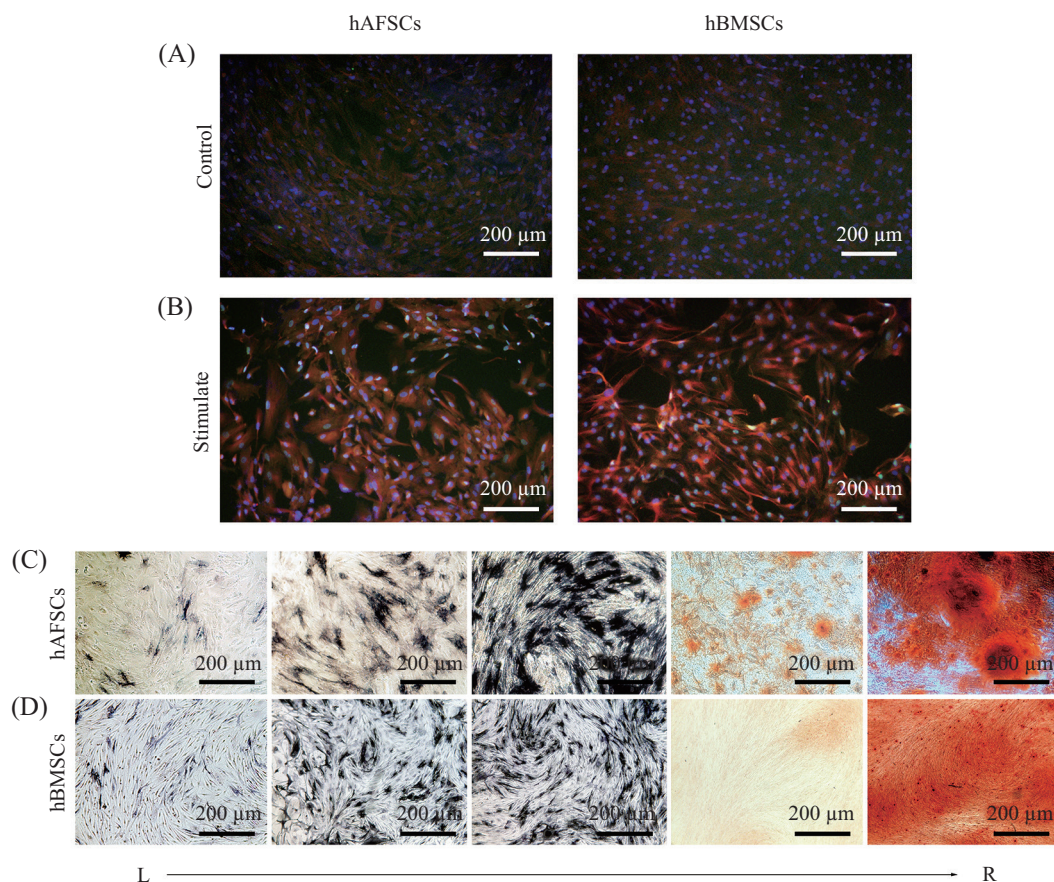
用前景^[26], 而来源便捷的羊水干细胞因具有潜在的多向分化潜能、无致瘤性、获取无创伤性、不涉及伦理道德等特点而备受关注^[27]。有学者已经发现, 羊水来源干细胞具有骨向分化的潜能, 这使得羊水来源干细胞被应用于口腔颌面部缺损的修复成为可能。而同样作为组织工程的种子细胞骨髓间充质干细胞也同样具有良好的骨向分化能力^[28], 因此, 本实验从细胞形态、增殖、骨向分化能力等方面对此两种细胞进行了比较。

首先, hAFSCs在形态上与hBMSCs类似, 亦表现为梭形。使用CCK-8对两种细胞的增殖能力进行鉴定发现, 两者无明显差别。此外采用流式细胞术对干细胞标志物的检测发现, 两种细胞均表达间充质干细胞的表面标志物CD44、CD90, 而不表达CD45、CD34、HLA-dr。使用基因芯片分析进一步显示, 两种细胞存在263个差异表达基因, 主要涉及

细胞结合、与胞外基质的作用以及炎症反应等生物学过程和功能^[29], 其基因表达差异与细胞表型差异的相关性有待进一步研究。

其次, 体外成骨诱导实验发现, hAFSCs在成骨诱导培养条件下, 碱性磷酸酶活性及矿化结节形成随时间逐步增加, 表现出成骨向分化的能力, 镜下观察成骨诱导第21天的茜素红染色结果发现, hAFSCs的矿化形成好于hBMSCs, 提示hAFSCs在成骨诱导条件下的矿化能力好于hBMSCs。

此外, 实时荧光定量PCR结果发现, 对于hAFSCs来说, RUNX2、OSX、ALP在整个成骨诱导过程中均较对照组有明显差异, 而COL I及OPN在第7天并没有明显高表达。相对来讲, hBMSCs与hAFSCs有所不同, COL I、ALP在成骨诱导全程高表达, RUNX2及OSX在诱导晚期, OPN在诱导早期并未与

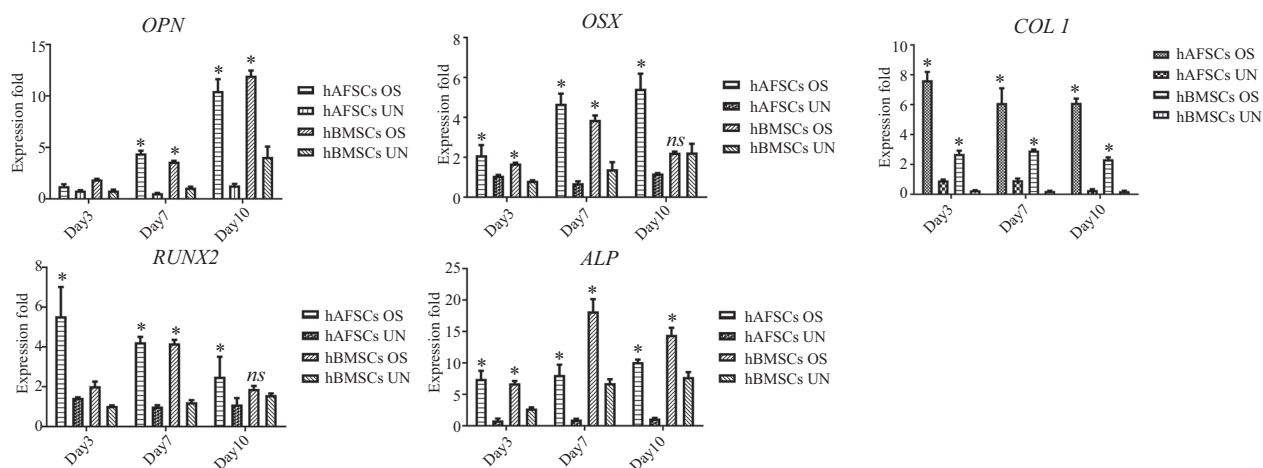


A、B: 对照组与诱导组hAFSCs与hBMSCs培养10天后的免疫荧光, 蓝色为DAPI, 红色为OPN, 绿色为Runx2; C、D: hAFSCs及hBMSCs的ALP染色(从左至右, 依次为对照组第5天, 诱导组第5、10天)及茜素红染色(从左至右, 对照组第21天, 诱导组第21天)。

A,B: immunofluorescence staining of hAFSCs and hBMSCs in the control and the induction group cultured after 10 days performed the blue, red and green fluorescence indicating DAPI, OPN and Runx2, respectively; C,D: hAFSCs and hBMSCs' ALP staining (from L to R, the control group at 5 days, the induction group at 5 days and 10 days) and Alizarin Red staining (the control group and the induction group at 21 days).

图3 hAFSCs与hBMSCs成骨分化比较

Fig.3 Comparison of osteogenic differentiation between hAFSCs and hBMSCs

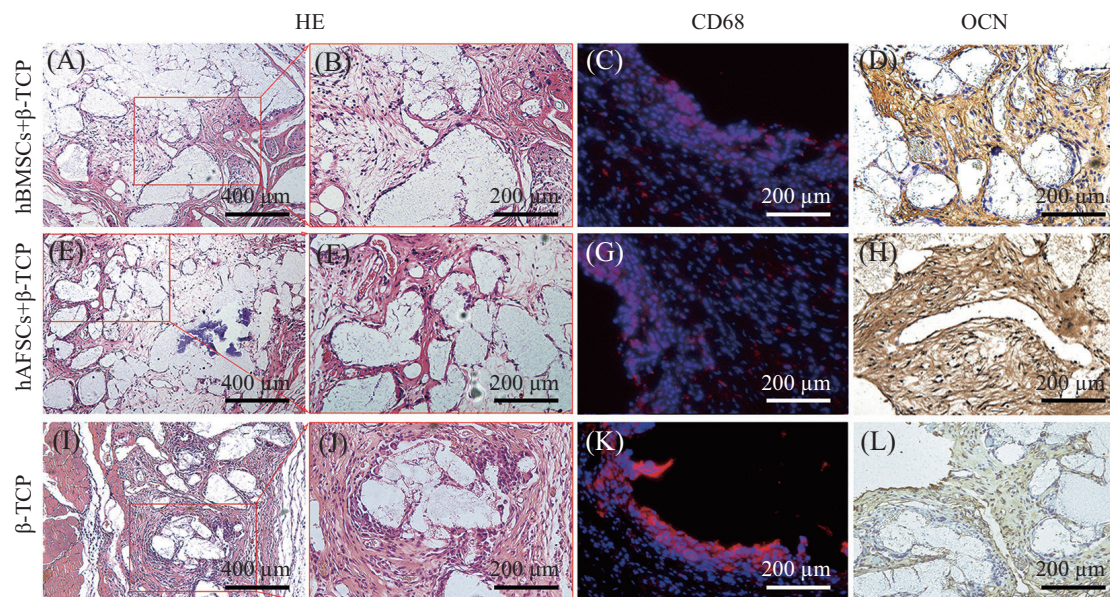


诱导组(OS)和对照组(UN)中的hAFSCs与hBMSCs在培养3、7、10天后OPN、OSX、RUNX2、ALP、COL 1的表达情况。* $P < 0.05$, 与hBMSCs UN组比较; ns: $P > 0.05$, 与hBMSCs UN组比较。

The expression of OPN, OSX, RUNX2, ALP, COL 1 in hAFSCs and hBMSCs of the control and induction group at 3, 7, 10 days. * $P < 0.05$ compared with hBMSCs UN group; n.s.: $P > 0.05$ compared with hBMSCs UN group.

图4 Real-time PCR结果

Fig.4 Results of Real-time PCR



A、E、I: 裸鼠异位成骨组织HE染色镜下观; B、F、J: 红色方框部分放大观; C、G、K及D、H、L: 异位成骨组织(红色荧光所示CD68⁺巨噬细胞聚集)及OCN(骨钙素)免疫组化染色。

A,E,I: histological findings of ectopic osteogenic tissue in nude mice of HE staining; B,F,J: histological findings at a high magnification; C,G,K and D,H,L: ectopic osteogenic tissue (CD68⁺ macrophage aggregation shown by red fluorescence) and OCN (osteocalcin) immunohistochemical staining.

图5 裸鼠异位成骨结果

Fig.5 Results of ectopic osteogenesis in nude mice

对照组有明显差异。但总体来说,两种细胞成骨向分化标志物的表达并没有很大差异。

裸鼠异位成骨的体内实验发现,加载hBMSCs与hAFSCs后可以抑制裸鼠体内β-TCP材料周围的巨噬细胞反应^[30],提示两种细胞在成骨过程中的炎症反应方面发挥某些作用。同时新骨周围细胞OCN的表达,进一步表明hBMSCs与hAFSCs均具有促进体内成骨分化的能力。然而,皮下区域的多种微环境因素会影响到祖细胞在体内的谱系归化,加之植入时间短未形成良好矿化,因此体内异位成骨实验并未获得如期效果。事实上,先前已有大量的研究表明,无论是hAFSCs还是hBMSCs,两者作为种子细胞载入支架去修复各种动物骨缺损模型都显示出良好的成骨效果^[31-35]。

总之,本实验结果表明,hAFSCs和hBMSCs均具有良好的体内外骨向分化能力,这为hAFSCs作为种子细胞被应用于口腔颌面部骨组织缺损修复提供了依据。现阶段而言,hAFSCs植入体内的生物学行为有待进一步探索,其与体内各细胞之间的相互作用也是影响载细胞支架植入后成骨性能因素之一。BALB等^[36]首次显示,hAFSCs主动释放具有明显旁分泌潜力和再生作用的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV),并且缺氧预处理显著诱导

了hAFSCs-EV中具有再生microRNA的外泌体的富集,进而改善植入部位血管生成。BASILE等^[37]研究发现,hAFSCs作为种子细胞植入体内可募集裸鼠体内的BMSCs,从而促进局部骨组织再生,提示其在骨修复中可与受体体内干细胞发挥协同作用。除此之外,hAFSCs在调节免疫方面亦发挥着重要作用。SATO等^[38]建立使用LPS诱导的大鼠脓毒血症模型,并于腹腔内注射hAFSCs,发现其能诱导M1-M2巨噬细胞极化,显著改善炎症导致的多器官损伤。可以看出,胚胎来源的干细胞无论是在作为种子细胞增强骨缺损的修复,抑或是在承担调节因子的角色改善体内炎症环境方面,都展现出极其广阔的前景。

参考文献 (References)

- [1] HU L, LIU Y, WANG S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration [J]. Oral Dis, 2018, 24(5): 696-705.
- [2] BAJESTAN M N, RAJAN A, EDWARDS S P, et al. Stem cell therapy for reconstruction of alveolar cleft and trauma defects in adults: a randomized controlled, clinical trial [J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2017, 19(5): 793-801.
- [3] SANDOR G K, NUMMINEN J, WOLFF J, et al. Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects [J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(4): 530-40.
- [4] GJERDE C, MUSTAFA K, HELLEM S, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a

- clinical trial [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 213.
- [5] WALMSLEY G G, RANSOM R C, ZIELINS E R, et al. Stem cells in bone regeneration [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2016, 12(5): 524-9.
 - [6] HUMBERT P, BRENNAN M A, DAVISON N, et al. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration [J]. *Front Immunol*, 2019, 10(663).
 - [7] TAKEUCHI R, KATAGIRI W, ENDO S, et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225472.
 - [8] TRUBIANI O, MARCONI G D, PIERDOMENICO S D, et al. Human oral stem cells, biomaterials and extracellular vesicles: a promising tool in bone tissue repair [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 4987.
 - [9] DIOMEDE F, GUGLIANDOLO A, CARDELLI P, et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 104.
 - [10] WANG P, LIU X, ZHAO L, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium [J]. *Acta Biomater*, 2015, 18: 236-48.
 - [11] GOSDEN C M. Amniotic fluid cell types and culture [J]. *Br Med Bull*, 1983, 39(4): 348-54.
 - [12] DE COPPI P, BARTSCH G, JR., SIDDIQUI M M, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 100-6.
 - [13] J. KIM Y L, H. KIM, K. J. HWANG, H. C. KWON, S. K. KIM,., YOU D J C S G K A J. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40: 75-90.
 - [14] TSAI M S, HWANG S M, TSAI Y L, et al. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(3): 545-51.
 - [15] ANTONUCCI I, PROVENZANO M, RODRIGUES M, et al. Amniotic fluid stem cells: a novel source for modeling of human genetic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 607.
 - [16] BERARDINELLI P, VALBONETTI L, MUTTINI A, et al. Role of amniotic fluid mesenchymal cells engineered on MgHA/collagen-based scaffold allotransplanted on an experimental animal study of sinus augmentation [J]. *Clin Oral Investig*, 2013, 17(7): 1661-75.
 - [17] KIM B S, CHUN S Y, LEE J K, et al. Human amniotic fluid stem cell injection therapy for urethral sphincter regeneration in an animal model [J]. *BMC Med*, 2012, 10: 94.
 - [18] COLTER D C, CLASS R, DIGIROLAMO C M, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3213-8.
 - [19] 杜晶春, 朱蕊, 徐霞. 人羊水来源间质干细胞的鉴定及其免疫调节功能和相关机制研究[J]. *实用医学杂志*(DU J C, ZHU R, XU X. The identification of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cell and its immunomodulatory function [J]. *The Journal of Practical Medicine*), 2013, 29(4): 529-32.
 - [20] ABE Y, OCHIAI D, MASUDA H, et al. In utero amniotic fluid stem cell therapy protects against myelomeningocele via spinal cord coverage and hepatocyte growth factor secretion [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(11): 1170-9.
 - [21] KLEIN J D, FAUZA D O. Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 698: 75-88.
 - [22] ANTONUCCI I, IEZZI I, MORIZIO E, et al. Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol [J]. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 9.
 - [23] MAROLT D, CAMPOS I M, BHUMIRATANA S, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(22): 8705-9.
 - [24] ZHANG W, ZHANG X, WANG S, et al. Comparison of the use of adipose tissue-derived and bone marrow-derived stem cells for rapid bone regeneration [J]. *J Dent Res*, 2013, 92(12): 1136-41.
 - [25] WANG F, YU M, YAN X, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(12): 2093-102.
 - [26] KOLIOS G, MOODLEY Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine [J]. *Respiration*, 2013, 85(1): 3-10.
 - [27] 司家文, 沈国芳, 郭礼和. 羊水来源干细胞骨向分化的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*(SI J W, SHEN G F, GUO L H. Research progress on osteogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2013, 35(8): 1221-4.
 - [28] CHARBORD P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(9): 1045-56.
 - [29] LI T, XIAO K, XU Y, et al. Identification of long noncoding RNAs expressed during the osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained from patients with ONFH [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1721-32.
 - [30] CHEN X, WANG M, CHEN F, et al. Correlations between macrophage polarization and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics [J]. *Acta Biomater*, 2020, 103: 318-32.
 - [31] RODRIGUES M T, LEE B K, LEE S J, et al. The effect of differentiation stage of amniotic fluid stem cells on bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6069-78.
 - [32] MARALDI T, RICCIO M, RESCA E, et al. Human amniotic fluid stem cells seeded in fibroin scaffold produce *in vivo* mineralized matrix [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(21/22): 2833-43.
 - [33] RICCIO M, MARALDI T, PISCIOTTA A, et al. Fibroin scaffold repairs critical-size bone defects *in vivo* supported by human amniotic fluid and dental pulp stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(9/10): 1006-13.
 - [34] NULTY J, FREEMAN F E, BROWE D C, et al. 3D Bioprinting of prevascularised implants for the repair of critically-sized bone defects [J]. *Acta Biomater*, 2021, 126: 154-69.
 - [35] SUBBIAH R, THRIVIKRAMAN G, PARTHIBAN S P, et al. Prevascularized hydrogels with mature vascular networks promote the regeneration of critical-size calvarial bone defects *in vivo* [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2021, 15(3): 219-31.
 - [36] BALBI C, PICCOLI M, BARILE L, et al. First characterization of human amniotic fluid stem cell extracellular vesicles as a powerful paracrine tool endowed with regenerative potential [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(5): 1340-55.
 - [37] BASILE M, MARCHEGIANI F, NOVAK S, et al. Human amniotic fluid stem cells attract osteoprogenitor cells in bone healing [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4643-54.
 - [38] SATO Y, OCHIAI D, ABE Y, et al. Prophylactic therapy with human amniotic fluid stem cells improved survival in a rat model of lipopolysaccharide-induced neonatal sepsis through immunomodulation via aggregates with peritoneal macrophages [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 300.