

人脐带和胎盘不同层次间充质干细胞的生物学特性分析

易笑¹, 刘凡¹, 陈枫¹, 王沂峰¹, 高毅²

1 南方医科大学 珠江医院妇产科, 广东 广州 510282

2 南方医科大学 珠江医院肝胆二科, 广东 广州 510282

易笑, 刘凡, 陈枫, 王沂峰, 高毅. 人脐带和胎盘不同层次间充质干细胞的生物学特性分析. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1183-1196.

YI X, LIU F, CHEN F, WANG YF, GAO Y. Comparison of biological characteristics of placenta mesenchymal stem cells derived from fetus. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1183-1196.

摘要: 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 在再生医学中具有广阔的应用前景, 其临床转化应用已成为研究热点, 如何大量获取原代间充质干细胞以及针对不同疾病选择最为合适的细胞来源是关键。为了探讨不同来源间充质干细胞的异同, 为临床治疗与研究选择合适的种子细胞提供参考, 文中比较了人脐带和胎盘不同层次间充质干细胞 (MSC) 的生物学特性, 包括细胞形态、表面标志物、分化能力及核型分析, 并对 4 种胎儿来源的 MSCs 进行了转录组序列分析, 针对转录组测序结果, 从增殖能力和分泌细胞因子等方面对不同来源的 MSCs 进行了分析验证。结果显示, 脐带 (umbilical cord, UC)、羊膜 (amniotic membrane, AM)、绒毛膜平滑肌层 (chorionic membrane, CM)、绒毛膜滋养层 (chorionic villi, CV) 和蜕膜 (deciduae, DC) 等 5 种不同来源的 MSCs 均符合 2006 年国际细胞治疗协会 (international society for cell therapy, ISCT) 的最低标准, 符合干细胞的一般特性; 核型分析表明除了 DC 来源 MSCs 来自母体, UC、AM、CM、CV 来源 MSCs 均来自胎儿; 转录组测序分析结果显示, 来自脐带和胎盘的 MSCs 具有相似的基因表达模式, 但也存在一些差异, 这些特定基因涉及细胞周期、细胞分裂、细胞死亡、细胞生长和发育。这些基因还在转录调节、DNA 修复、DNA 复制和染色体稳定性中起作用, 这是细胞或亚细胞组分运动、细胞通信、细胞组织突起、细胞因子分泌和激素代谢的重要组成部分。转录组测序分析的结果在一

Received: March 23, 2021; **Accepted:** September 6, 2021; **Published online:** September 14, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1106400, 2018YFA0108200); National Natural Science Foundation of China (31972926); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2015B020229002); Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2014A030312013, 2018A030313128); Guangdong Key Research and Development Plan, China (2019B020234003); Science and Technology Program of Guangzhou, China (201803010086)

Corresponding author: GAO Yi. E-mail: Gaoyi@smu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1106400, 2018YFA0108200); 国家自然科学基金 (31972926); 广东省科技计划 (2015B020229002); 广东省自然科学基金 (2014A030312013, 2018A030313128); 广东省重点领域研发计划 (2019B020234003); 广州市科技计划 (201803010086)

一定程度上解释了不同来源的 MSCs 之间生物学特征的差异; 基于测序结果的验证实验可知, 不同来源的 MSCs 在增殖能力和细胞因子分泌能力存在显著差异。总的来说, UC-MSCs 和 CV-MSCs 表现出更强的增殖能力, 分泌更高水平的旁分泌因子, 可能在未来疾病的治疗中有不同的优势。

关键词: 胎盘; 脐带; 间充质干细胞; 干细胞; 生物学特性; 核型分析

Comparison of biological characteristics of placenta mesenchymal stem cells derived from fetus

YI Xiao¹, LIU Fan¹, CHEN Feng¹, WANG Yifeng¹, GAO Yi²

1 Department of Gynecology, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China

2 Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs) have broad application potentials in regenerative medicine and translational medicine. Obtaining large quantities of primary-cultured MSCs and select the most suitable cell origin for targeted diseases are critical to research. To select the most suitable seed cells of MSCs from different origins for clinical treatment and research, biological characteristics of MSCs from human umbilical cord and placenta were compared. These include cell morphology, surface marker expression, differentiation and karyotype. Transcriptome sequencing of four MSCs from fetus were performed and the results were analyzed from the perspective of proliferation and cytokine secretion. The results revealed that MSCs from umbilical cord (UC), amniotic membrane (AM), chorionic membrane (CM), chorionic villi (CV) and deciduae (DC) met the minimum standards of the International Society of Cell Therapy (ISCT) in 2006 and had the general characteristics of stem cells. Karyotype analysis showed that MSCs derived from UC, AM, CM and CV were all from fetus except that the DC-MSCs were from mother. Transcriptome sequencing analysis showed that hMSCs from umbilical cord and placenta had similar gene expression patterns, while different expression patterns were observed in specific genes involved in cell cycle, cell division, cell death, cell growth and development. These genes play important roles in transcriptional regulation, DNA repair, DNA replication and chromosome stability, which were momentous components of cellular or subcellular fraction movement, cell communication, cell tissue protrusions, cytokine secretion and hormone metabolism. Transcriptome sequencing analysis explained the differences in biological characteristics among MSCs from different sources, while verification experiments based on the transcriptome sequencing results showed that the proliferation and cytokine secretion capabilities of MSCs from different sources were significantly different. In all, UC-MSCs and CV-MSCs with stronger proliferation and higher levels of paracrine factors secretion may show their respective advantages in treating diseases.

Keywords: placenta; umbilical cord; mesenchymal stem cells; stem cells; biological characteristics; karyotype analysis

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 广泛存在于多种组织中, 包括骨髓、脂肪、胎盘等^[1-3]。由于其能够自我更新及多向分化, 并表现出旁分泌、免疫调节等多种功能, MSCs 被认为是细胞治疗最具应用前景的种子细胞。目前 MSCs 疗法可以作为一种新兴疗法用于治疗骨/软骨疾病、肾病、糖尿病、神经系统疾病以及免疫性疾病^[4-14]。

MSCs 最早发现于骨髓, 已有研究表明^[2-3], 脐带和胎盘间充质干细胞具有与骨髓 MSCs 相似的生物学特性, 来源于脐带和胎盘的间充质干细胞由于无需采取有创性操作, 属于产后的医疗废弃物, 并且提取方便, 不受伦理限制, 被认为是较佳的 MSCs 种子细胞来源。胎盘结构复杂, 人们已经从羊膜 (AM)、绒毛膜平滑肌层 (CM)、绒毛膜滋养层 (CV) 和蜕膜 (DC) 中分离出间充质干细胞。尽管脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 和胎盘间充质干细胞 (P-MSCs) 表面表达相似的标记物, 且具有较高的自我更新和多系分化能力, 但不同来源的间充质干细胞已经被证明有不同的生物学特征, Kim 等^[15]证明了绒毛膜来源的间充质干细胞脂肪生成相关基因的表达高于脐带间充质干细胞, 两者都表达成熟肝细胞标志物, 但脐带间充质干细胞比绒毛膜间充质干细胞表达更多。González 等^[16]比较了胎儿和母体来源分离的胎盘间充质干细胞, 发现绒毛膜间充质干细胞具有优越的分化、免疫抑制和血管生成潜力。Ma 等^[17]报道了在无血清培养下, AM-MSCs、UC-MSCs 和 CP-MSCs 之间的分化潜能、基因表达模式以及增殖能力的差异, 证实了羊膜来源的间充质干细胞表现出更高的成骨分化效率; 绒毛膜来源的 MSCs 具有更好的成脂分化效率和增殖能力。此背景下, 尚未有研究对脐带及胎盘来源的 5 种 MSCs 进行生物学特性的分析和比较,

另外, 虽然已有研究报道了来源于不同新生儿组织的 MSC 之间的基因表达模式分析^[18-19], 然而, 据我们所知, 尚无关于 5 种胎盘细胞来源中基因表达模式的比较分析, 转录组测序分析的结果在一定程度上可解释来自不同来源的 MSC 之间生物学特性的差异。国际细胞治疗协会 (international society for cell therapy, ISCT) 虽然给出了 MSCs 的最低标准, 但这些最低标准并不是 MSCs 的特异性标准, 我们需要全面地认识 5 种 MSCs 在生物学和潜在治疗用途上的差异, 未来可以根据这些差异性来选择合适的细胞来源进行针对性疾病治疗。

1 材料与方法

1.1 材料来源

经广州南方医科大学珠江医院医疗中心伦理委员会批准 (批准号: 2019-KY-015-02) 和患者及家属的书面知情同意后, 收集年龄小于 35 岁、无传染病、孕龄大于 35 周、胎膜破裂小于 18 h、无感染、男性胎儿的产妇胎盘。

1.2 试剂与仪器

间充质干细胞培养基 (Haoyang); 2.5% 胰酶溶液 (Sigma)、胎牛血清 (Gibco)、秋水仙素 (北京百奥莱博科技有限公司)、MSCs 成骨分化培养基 (Stemcell Technologies)、MSCs 成脂分化培养基 (Stemcell Technologies)、MSCs 成神经分化培养基 (Promocell GmbH)、油红 O 染液 (Sigma)、茜素红染液 (Sigma)、尼氏染液 (Sigma)、Giemsa 染色液 (Gibco)。CO₂ 培养箱 (德国 Advantage.Lab 公司)、6 孔板 (美国 Corning)、流式细胞仪 (BD FACSVerse)、明场正置显微镜 (德国 DM2500)

1.3 方法

收集男性新生儿脐带和胎盘样本, 并对提取得到的脐带和胎盘来源的 5 种间充质干细胞

进行生物学特性分析和转录组基因测序分析。

1.3.1 脐带间充质干细胞的分离与培养

在无菌条件下,用生理盐水清洗脐带后,剪成小块,继续用 PBS 冲洗至上清变澄清,用手持匀浆器处理组织至细小颗粒状,150 ×g 离心 5 min 后,弃去上清,将组织块平铺于培养瓶中,加入适当间充质干细胞培养基,置于 5% CO₂ 培养箱中进行培养。3 d 内禁止移动,3 d 后细胞贴壁后即可少量换液,此后视细胞生长情况换液。

1.3.2 胎盘不同层次间充质干细胞的分离与培养

在无菌条件下,用生理盐水清洗胎盘后,剪成小块,继续用 PBS 冲洗至上清变澄清,加入等体积的胰蛋白酶液体后,放入 37 °C 摇床振荡约 1 h,直至组织块被消化成粘稠状态,150 ×g 离心 5 min 后,弃去上清,加入适当培养基,转移至培养瓶中放入 5% CO₂ 培养箱中进行培养。3 d 内禁止移动,3 d 后细胞贴壁后即可少量换液,此后视细胞生长情况换液。

1.3.3 免疫表型的测定

将第 3 代的 MSCs 用胰蛋白酶消化、洗涤,离心并稀释至 1×10⁷ 个细胞/mL,然后将 200 μL 细胞悬液分别分配到 7 个流式管中。然后添加以下内容: FITC 小鼠抗人类 CD90 (5 μL)、PE 小鼠抗人类 CD44 (5 μL)、Percp-CyTM5.5 小鼠抗人类 CD105 (5 μL)、APC 小鼠抗人类 CD73 (5 μL)、hMSC 阳性同种型对照混合物 (20 μL) 和 PE hMSC 阴性同种型对照混合物 (20 μL)。室温避光孵育 30 min,然后用 1 mL PBS 洗涤 2 次,150 ×g 离心 5 min。将细胞重悬于 500 μL PBS 中,最后,通过流式细胞术检测其表面干细胞标志物。

1.3.4 胎盘间充质干细胞的成脂、成骨和神经分化潜能

将第 3 代胎盘间充质干细胞接种于 6 孔板

中,密度约为 3×10⁴ 个细胞/L。显微镜下观察细胞融合度达到 80%–90%时,去除无血清培养基,分别加入预先配好的成脂、成骨和成神经的诱导培养基。72 h 更换一次成脂和成骨分化培养皿中的培养基,共 10–15 d。每 48 h 更换一次神经细胞分化培养皿中的培养基直至出现神经元分化。当成脂诱导组的细胞质中出现脂肪空泡时,油红 O 染色。成骨诱导组见圆形钙化结节形成,茜素红染色。在神经源性分化的第 1 天,观察到明显的形态学变化,培养后至少 3 d 进行 Nissl 染色。免疫组化检测胎盘组织中间充质干细胞的分布情况,得到胎盘不同水平 (UC、AM、CV、CM、DC) 的组织。常规脱水、切片、苏木精-伊红染色、免疫组化、显微镜下成像。

1.3.5 核型分析

UC-MSCs、AM-MSCs、CV-MSCs、CM-MSCs 和 DC-MSCs 均来自同一胎盘 (男性新生儿) 的 3 个样本。收集 2×10⁶ 个细胞,并向培养基中加入 0.2 μg/mL 秋水仙碱溶液。2 h 后,向培养物中加入 0.075 mol/L KCl 溶液,并将细胞在 37 °C 水浴中孵育。然后,加入 1 mL 固定剂 (甲醇/乙酸 1:3 混合),将样品在 37 °C 下孵育 30 min 并离心 8 min。再加入 8 mL 固定剂,将细胞用 10% Giemsa 染色 8 min,用蒸馏水洗涤。最后在电子显微镜下观察固定的细胞。

1.3.6 转录组测序

基于核型分析,选择了来自同一个体分离的胎儿来源的 4 种 MSCs 进行了转录组测序。转录组数据由北京诺禾致源科技股份有限公司 (<http://www.novogene.com>) 提供。我们对基因表达数据进行了统计分析,以筛选在不同状态下显著差异表达的基因。RNA 定量和鉴定完成后,文库制备使用 Illumina 的 NEBNext Ultra RNA 文库制备试剂盒 (美国 New England Biolabs, Inc.)。总 RNA 的起始材料 (100 ng) 是使用

oligo dT 珠系统富集的 mRNA。随后使用酶促片段化将分离的 mRNA 片段化。然后, 进行第一链合成和第二链合成, 并纯化双链 cDNA。对 cDNA 进行末端修复和 3'腺苷酸化, 将 Illumina 测序接头连接到片段的末端, 并纯化文库 (AMPure XP)。mRNA 链文库用聚合酶链反应 (PCR) 预扩增并纯化 (AMPure XP)。文库的大小分布经过验证, 并在 Agilent Bioanalyzer 2100 上检查质量。我们使用 TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) 进行聚类分析。在产生簇之后, 将文库制备物在 Illumina HiSeq 平台上测序。对于京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和基因本体-生物过程 (GO-BP) 都是使用 clusterProfiler(3.9)R 软件进行的。

1.3.7 检测 MSCs 细胞的增殖能力

通过计算脐带及胎盘 5 种来源的 MSCs 从 P3-P10 代的细胞倍增时间来评估不同来源的细胞增殖能力。将 5 种来源的第 3 代的 MSCs 分别分离为单细胞悬液, 并将其以 1×10^4 个细胞/孔接种在 6 孔培养板中, 使用血细胞计数器计数方法对细胞计数, 直至达到 100% 融合, 计算细胞倍增时间。

细胞倍增时间 (PDT) = $(CT \times \ln 2) / \ln(N_f / N_i)$, 其中 CT 是细胞培养时间, N_i 是初始细胞数, N_f 是最终细胞数。

1.3.8 脐带及胎盘 5 种来源 MSCs 分泌的生长因子和细胞因子的检测

将脐带及胎盘不同来源 MSCs 细胞以 10 000 个细胞/cm² 的浓度分别接种于无血清培养基中。72 h 后, 分别收集无细胞上清液并保存在 -80 °C。将准备好的样品采用 ELISA 试剂盒, 根据说明书测定人血管生成素-1 (Ang-1) (Abcam, UK, ab99972)、肝细胞生长因子 (HGF) (Abcam, ab100534)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) (Abcam, 100545)、转化生长因子 (TGF) (Abcam, ab100647) 和血管内皮生长因子 (VEGF) (Abcam, ab100662), 从而得出上清中各种 MSC 因子的含量。

2 结果与分析

2.1 脐带和胎盘不同层次间充质干细胞的形态学观察

2.1.1 组织块贴壁法

原代培养的人脐带间充质干细胞和胎盘间充质干细胞均贴附在组织培养瓶上, 在显微镜下观察呈现出成纤维样细胞的形态, 3-10 d 可见细胞从组织块爬出, 7-10 d 可见细胞围绕组织块局部密麻生长, 细胞呈平行或漩涡状。传代 10 代后细胞形态保持不变。图 1 是组织块培养法第 1 天、第 7 天和第 3 代的细胞。

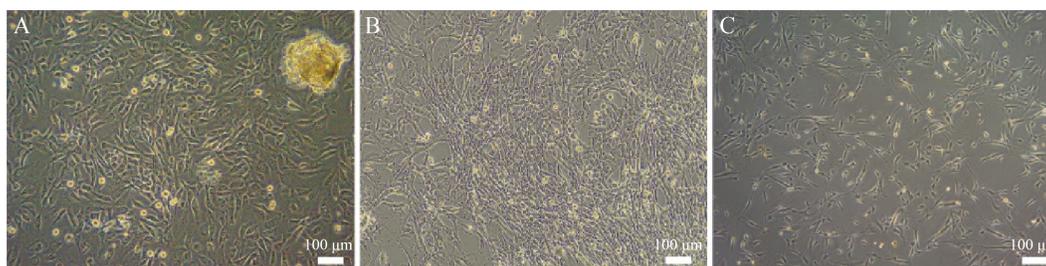


图 1 组织块贴壁法分离的间充质干细胞形态学观察

Figure 1 Morphological observation of mesenchymal stem cells isolated by tissue explant method. A, B and C are day 1, day 7 and third-generation MSCs, respectively.

2.1.2 酶消化法

原代培养的人脐带间充质干细胞和胎盘间充质干细胞均贴附在组织培养瓶上, 3 d 左右可见少量细胞贴壁, 7-10 d 可见细胞大量生长, 在显微镜下观察呈现出成纤维样细胞的形态, 传代 10 代后细胞形态保持不变。图 2 是酶消化法第 1 天、第 7 天和第 3 代的细胞。

2.2 流式细胞术检测细胞表面标记

流式分析结果显示, 所有 MSCs 干细胞标记物 CD73、CD90、CD105 均呈阳性, 表达率高于 95%, CD34、CD19、CD11b、CD45、HLA-DR 均呈阴性, 表达率低于 2%, 均达到了国际细胞治疗协会的标准 (ISCT) (图 3)。

2.3 MSCs 诱导分化及染色结果

MSCs 成脂诱导 7 d 左右, 细胞形态观察可见细胞从纤长的纺锤状细胞逐渐变化为肥大细胞。7-8 d 后, 形成了少量的细胞质脂质小滴,

11 d 后, 形成大量的脂肪细胞。油红 O 染色可见细胞内的大量脂滴形成(图 4A)。成骨培养基诱导的 MSCs 培养 3 周左右, 细胞由长梭形向立方形转变, 呈鹅卵石形态, 细胞内出现大量致密沉积物。茜素红染色后发现沉积物被染成红色, 确定细胞产生钙结节, 细胞表现出明显的成骨活性 (图 4B)。成神经诱导 1 d 后, 即可见细胞形态由长梭形变圆, 呈颗粒状, 随后细胞呈扁平状, 部分伸出突起, 尼氏染色发现黑蓝色的尼氏小体, 证明细胞向神经元分化 (图 4C)。

2.4 核型分析

3 例胎儿为男性的产妇胎盘中, 脐带、羊膜、绒毛膜平滑肌层、绒毛膜滋养层间充质干细胞均为 (2n), 46, XY, 与男性胎儿的染色体核型一致, 证明为胎儿来源的 MSCs; 蜕膜间充质干细胞均为 (2n), 46, XX, 与母亲的染色体核型一致, 证明为母体来源的 MSCs (图 5)。

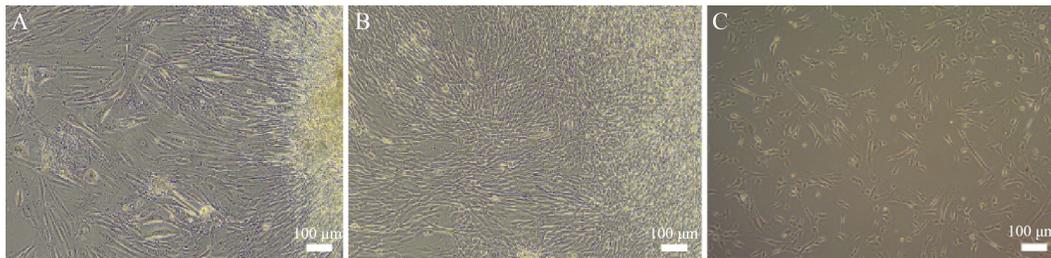


图 2 酶消化法分离的间充质干细胞形态学观察

Figure 2 Morphological observation of mesenchymal stem cells isolated by enzyme digestion method. A, B and C are day 1, day 7 and third-generation MSCs, respectively.

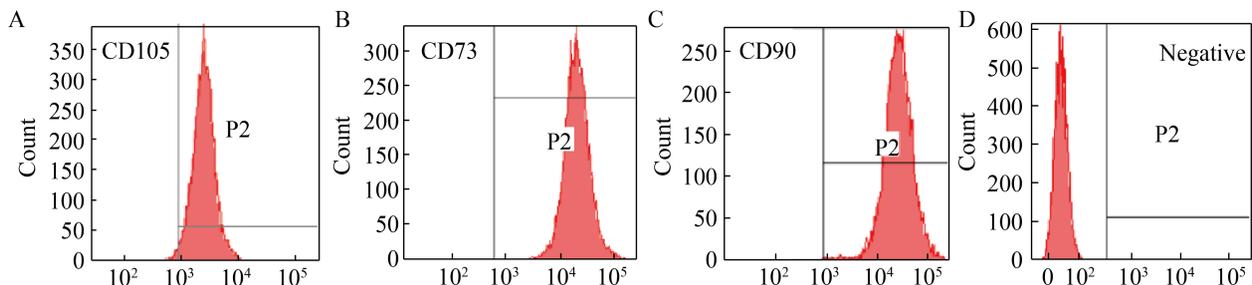


图 3 流式细胞仪分析 MSCs 的表面标志物

Figure 3 Flow cytometric analysis of the expression of surface markers on MSCs. (A) CD105. (B) CD73. (C) CD90. (D) CD34, CD19, CD116, CD45 and HLA-DR.

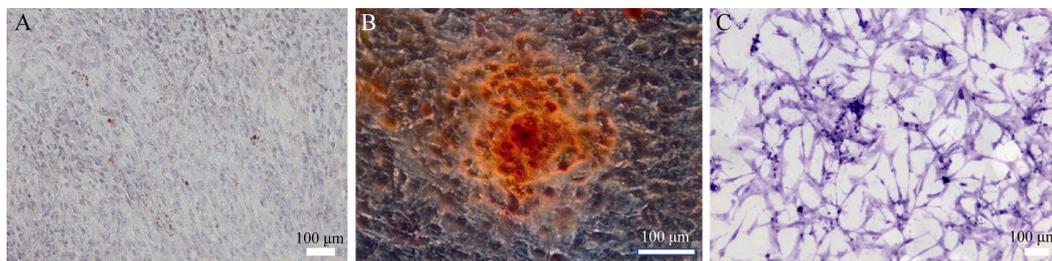


图4 脐带间充质干细胞和胎盘间充质干细胞的分化潜能 (100×)

Figure 4 The differentiation potentials of UC-MSCs and placental MSCs. Dyeing way: A: oil red O (adipogenic differentiation); B: alizarin red (osteogenic differentiation); C: cresyl violet (neurogenic differentiation).

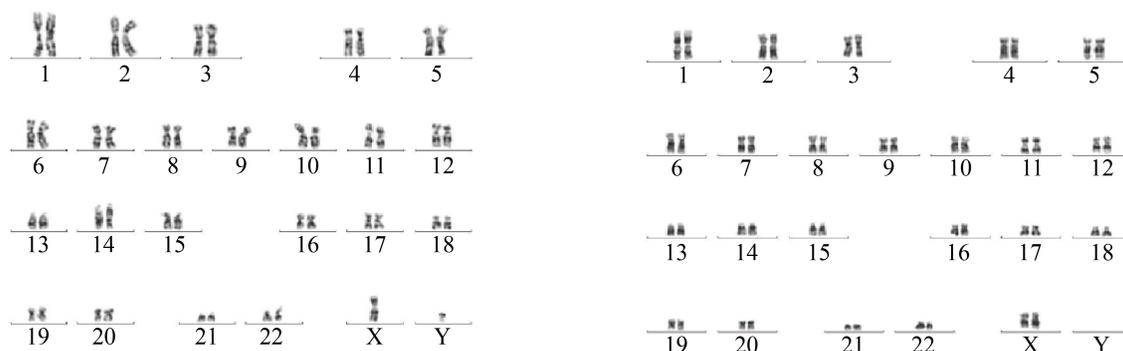


图5 不同来源 MSCs 核型分析

Figure 5 Karyotype analysis of MSCs from different origins.

2.5 转录组测序分析

为了分析 UC-MSCs、AM-MSCs、CV-MSCs、CM-MSCs 的功能差异,我们对不同组织来源的 MSCs 的所有差异显著性基因进行了富集分析。分析发现,来自 4 种不同来源的人脐带和胎盘 MSCs 之间的 mRNA 表达在有丝分裂、激素水平激素代谢的调节、胚胎器官的血管生成、细胞因子活性与微管蛋白的结合以及趋化因子活性方面存在显著差异。我们从 KEGG 富集分析的结果中选择最重要的通路绘制柱状图和散点图来展示统计结果;从 GO 富集分析的结果中选择了最重要的项绘制柱状图来展示统计结果。

2.5.1 AM-MSCs 与 UC-MSCs 的基因表达水平比较

KEGG 结果:主要在细胞周期、DNA 复制、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、间隙连

接、ECM-受体相互作用和细胞衰老等方面有差异基因。

GO 结果:染色体分离、DNA 复制、DNA 复制起始、减数分裂核分裂、有丝分裂细胞周期相变、有丝分裂核分裂、有丝分裂姐妹染色单体分离、核染色体分离、姐妹染色单体分离、细胞外基质、3'→5' DNA 解旋酶活性、趋化因子活性、细胞因子活性、DNA 解旋酶活性、细胞骨架的结构成分等方面有差异基因(图 6)。

2.5.2 CM-MSCs 与 UC-MSCs 的基因表达水平比较

KEGG 结果:主要在吞噬体、细胞周期、间隙连接、ECM-受体相互作用、PPAR 信号通路、类固醇激素的合成、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、补体、花生四烯酸代谢凋亡、p53 信号通路等方面有差异基因。

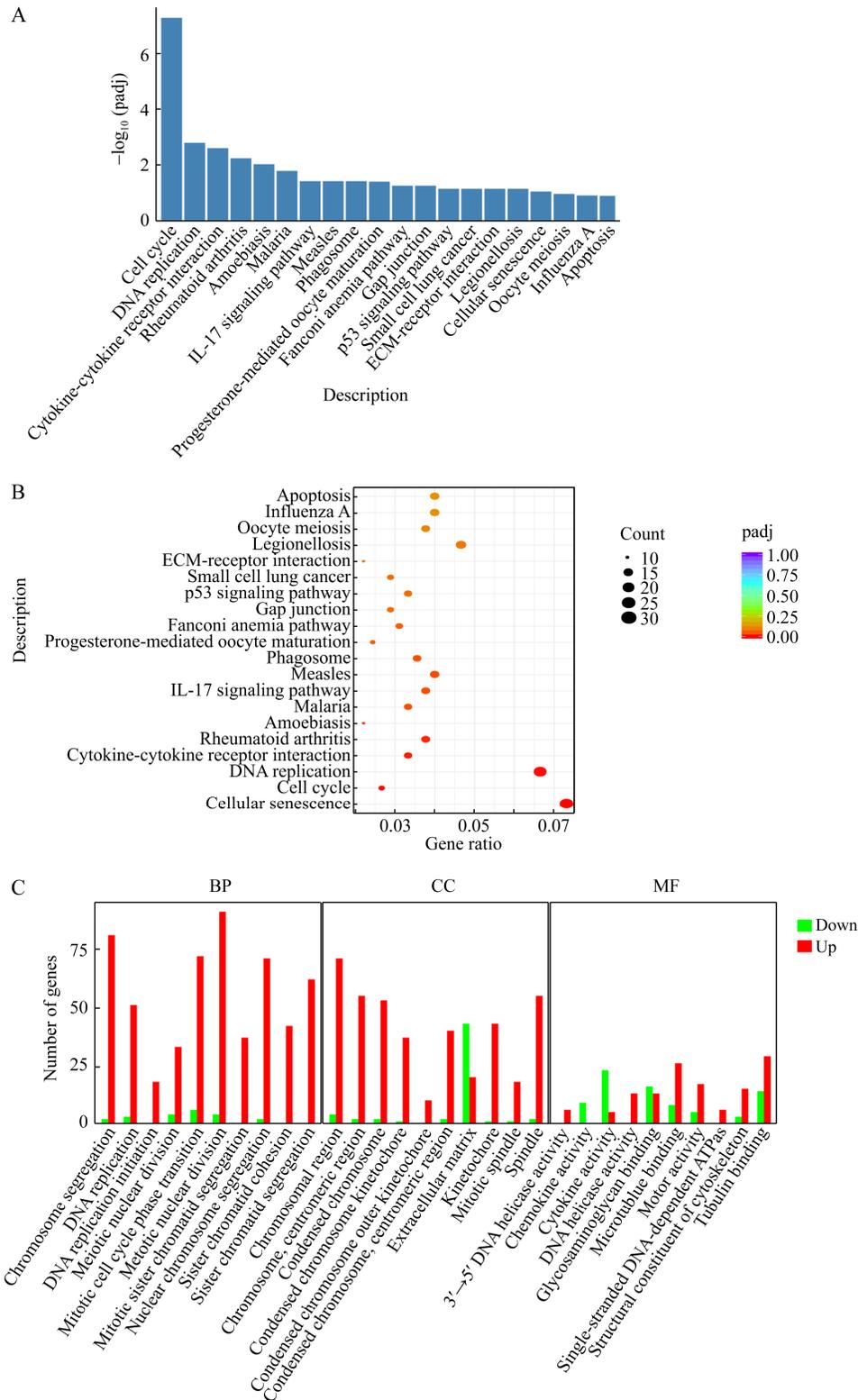


图 6 羊膜间充质干细胞和脐带间充质干细胞的基因表达水平比较

Figure 6 Comparison of gene expression levels of AM-MSCs and UC-MSCs. (A, B) KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes. (C) GO enrichment analysis of differentially expressed genes.

GO 结果: 血管生成、血管形态发生、染色体分离、胚胎器官发育、激素代谢过程、有丝分裂核分裂、核染色体分离、激素水平的调节、姐妹染色单体分离、细胞外基质、驱动蛋白复合物、蛋白质细胞外基质、微管、胶原结合、细胞因子活性、纤连蛋白结合、糖胺聚糖结合、胰岛素样生长因子结合等方面有差异基因 (图 7)。

2.5.3 CV-MSCs 与 UC-MSCs 的基因表达水平比较

KEGG 结果: 主要在类固醇激素的合成、间隙连接、紧密连接、抗原处理和展示、p53 信号通路、补体和凝血级联反应、造血细胞谱系、糖鞘脂的生物合成、细胞因子-细胞因子受体相互作用、PPAR 信号通路等方面有差异基因。

GO 结果: 胚胎形态发生、胚胎器官发育、胚胎器官形态发生、蛋白质激酶的正调控、激素水平的调节、骨骼系统开发、细胞外基质、粗面内质网、胶原结合、糖胺聚糖结合、透明质酸结合、氧化还原酶活性、细胞骨架的结构成分、转录因子活性等方面有差异基因 (图 8)。

2.6 不同来源 MSCs 增殖能力比较

对 UC-MSCs、AM-MSCs、CM-MSCs、CV-MSCs、DC-MSCs 的平均群体倍增时间 (PDT) 的分析可知 (图 9), 脐带及胎盘不同来源间充质干细胞在同一培养条件下, 增殖能力有所不同, 增殖速度由快到慢依次为 UC-MSCs、CM-MSCs、CV-MSCs、AM-MSCs、DC-MSCs。

2.7 不同来源 MSCs 分泌的生长因子和细胞因子的比较

不同来源的 MSCs 分泌的生长因子和细胞因子可能存在很大差异 (图 10)。这些旁分泌因子包括人血管生成素-1 (Ang-1)、肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、转化生长因子 (TGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF)。在这 5 种组织中, Ang-1 在 DC-MSCs 中最高,

HGF 和 VEGF 在 UC-MSCs 中最高, TGF 在 CV-MSCs 中最高, IGF-1 的分泌在 AM-MSCs 中最高, 与 AM-MSCs, CM-MSCs 和 DC-MSCs 相比, CV-MSCs 和 UC-MSCs 分泌更高水平的旁分泌因子。组间差异有统计学意义。

3 讨论

间充质干细胞被认为是具有较强的更新增殖能力和多谱系分化能力的细胞^[20], 不同来源的干细胞可塑性强, 目前已经广泛地从多种组织 (包括骨髓、脂肪、牙齿、肌肉、羊水、脐血、胎盘、脐带等) 中分离出来^[21-26]。自从 20 多年前首次报道其临床应用以来, MSCs 的免疫调节、抗炎、血管生成、抗凋亡和营养特性以及其易于分离和扩增的特性激发了许多关于 MSCs 的研究, 目前在 FDA.gov 上已注册了 1 000 个涉及 MSCs 的临床试验, 主要关注于组织修复和再生, 也包括免疫调节和移植抗宿主疾病^[27]。

然而, MSCs 从实验室的疗效在临床实践中存在挑战, 导致 MSCs 临床开发失败的原因包括在制备 MSCs 产品的过程中, 由于供体不同的健康状况、性别、年龄造成的 MSCs 异质性, 以及不同来源的 MSCs, 细胞的遗传稳定性和分化能力稳定性也不同, 在不同的培养条件下细胞扩增水平也有差异, 这些都会影响 MSCs 治疗的疗效。其次, 在临床应用中, 不同的给药途径 (如局部注射或全身输注)、在不同的注射部位和输注时间、细胞载体材料的不同以及 MSCs 的归巢和迁移能力的不同都是需要考虑的问题。目前临床研究中使用的 MSCs 都是异种移植, 供体和受体之间的免疫相容性是降低排斥反应风险的关键^[28-29]。为避免在不同条件下培养的不同个体的 MSCs 相关的问题, 在这项研究中, 我们成功地从 5 种胎盘组

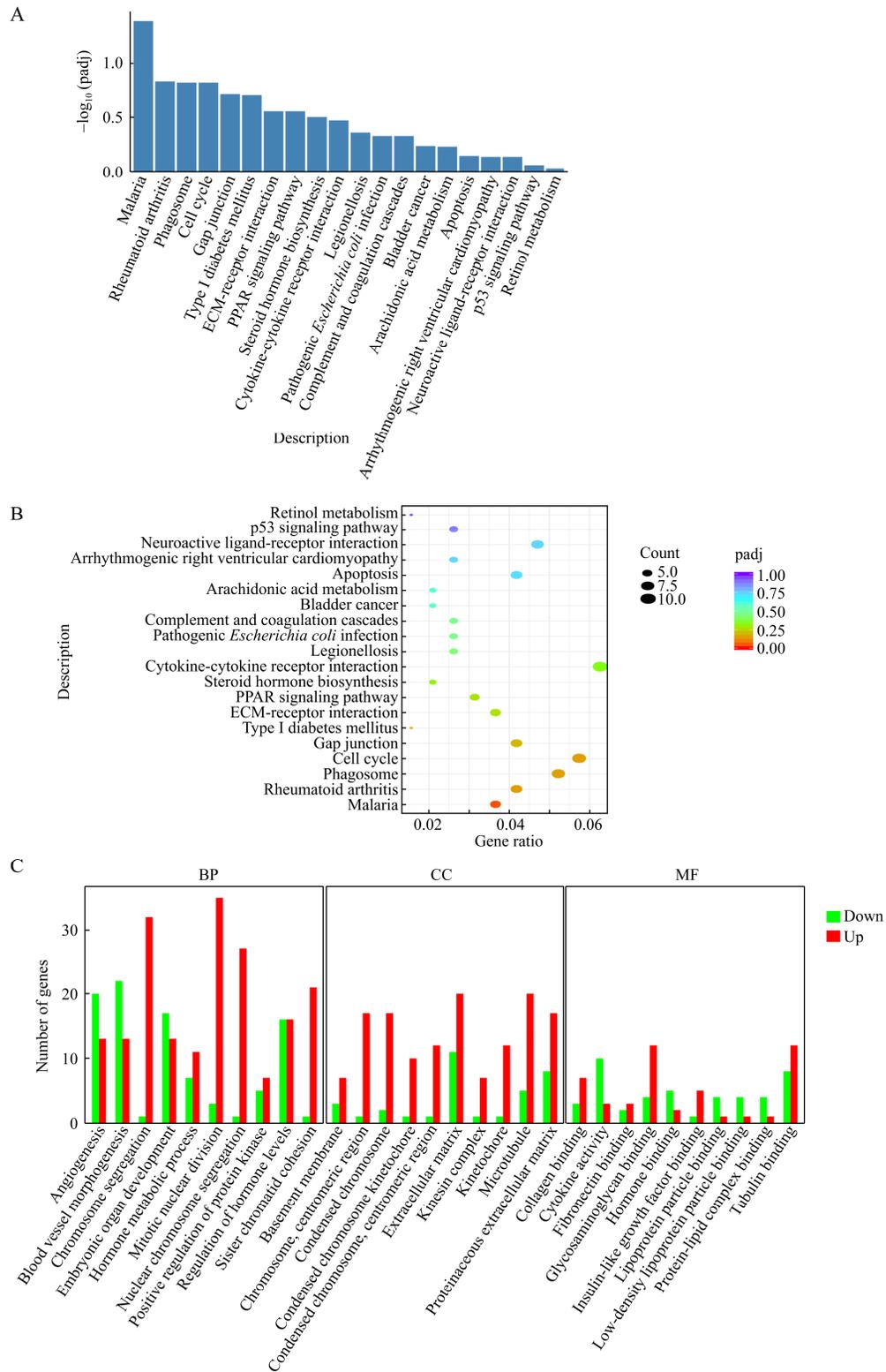


图 7 绒毛膜平滑肌层间充质干细胞和脐带间充质干细胞的基因表达水平比较

Figure 7 Comparison of gene expression levels of CM-MSCs and UC-MSCs. (A, B) KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes. (C) GO enrichment analysis of differentially expressed genes.

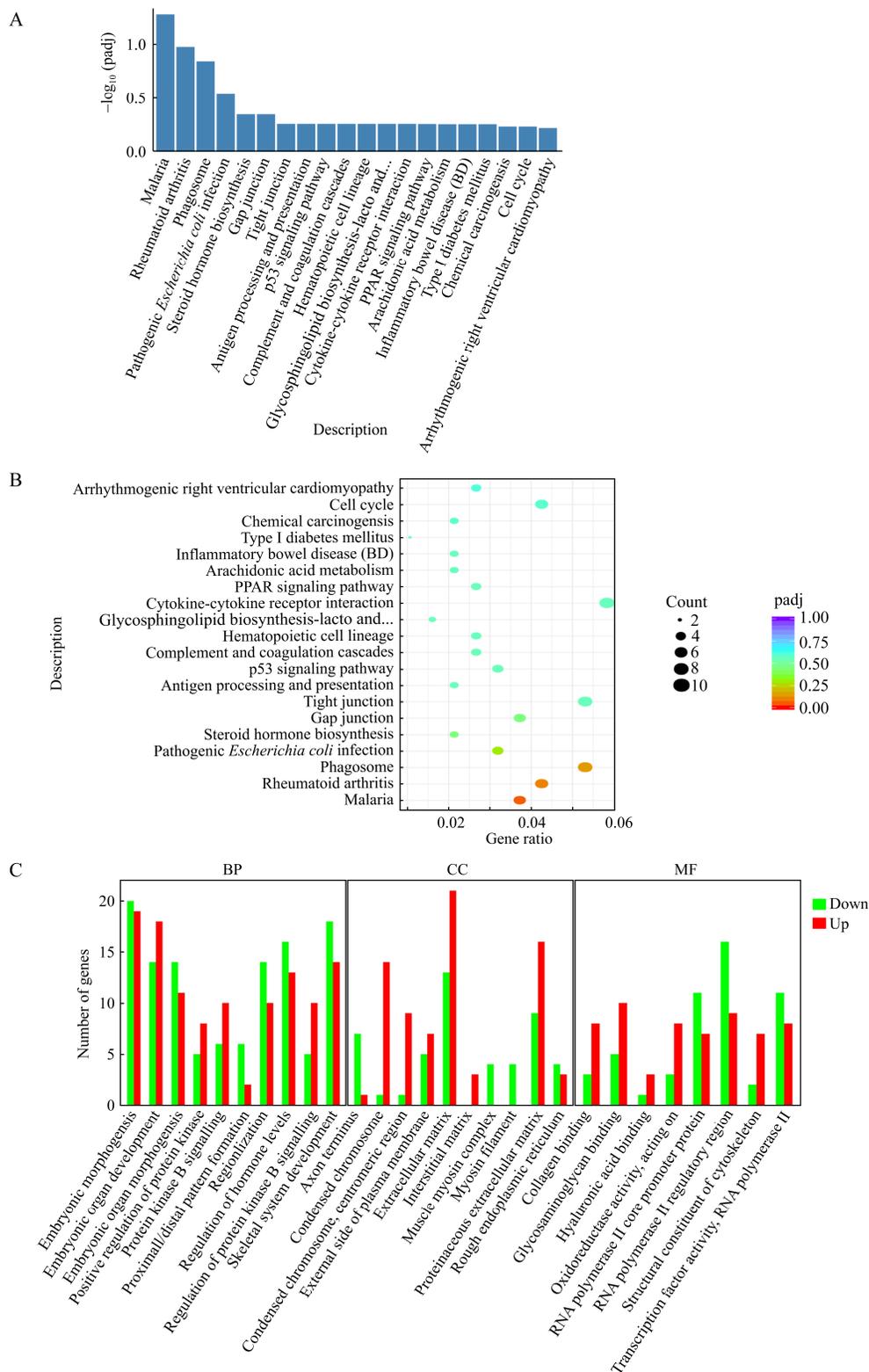


图 8 绒毛膜滋养层间充质干细胞和脐带间充质干细胞的基因表达水平比较

Figure 8 Comparison of gene expression levels of CV-MSCs and UC-MSCs. (A, B) KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes. (C) GO enrichment analysis of differentially expressed genes.

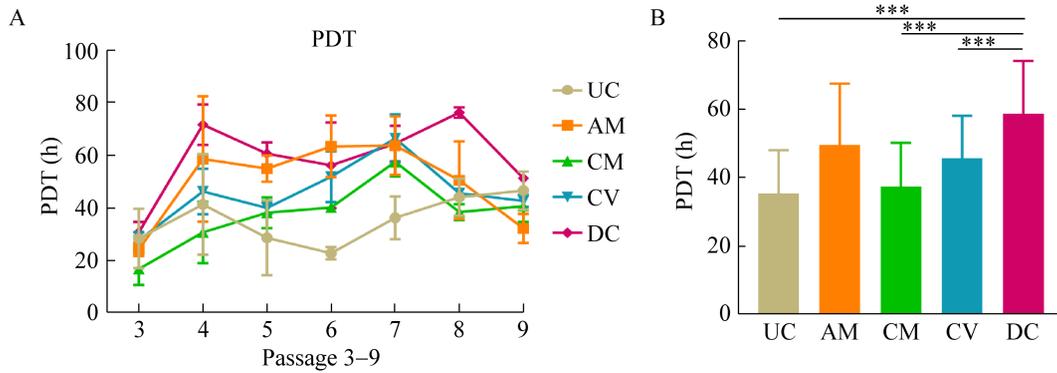


图9 不同来源的MSCs在P3-P9时的种群倍增时间(PDT)

Figure 9 Comparison of population doubling time (PDT) of MSCs from different origins at P3-P9: UC-MSCs < CM-MSCs < CV-MSCs < AM-MSCs < DC-MSCs. (A) Line graph. (B) Column diagram. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

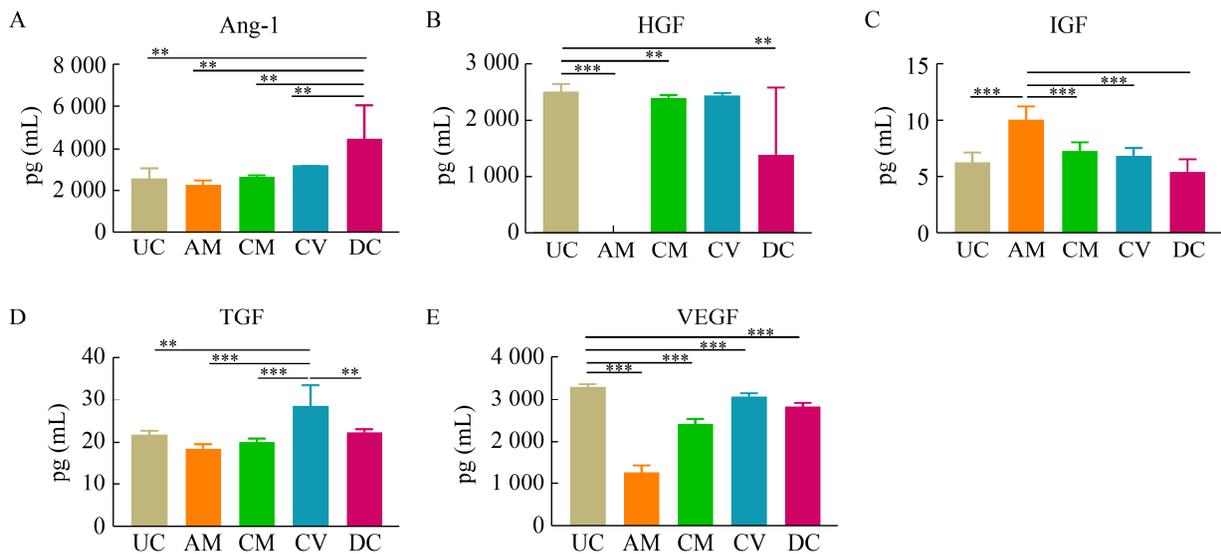


图10 比较不同来源的MSCs分泌的不同MSC因子的异同

Figure 10 Comparison of different MSC factors secreted from MSCs of different origins. (A) Ang-1. (B) HGF. (C) IGF. (D) TGF. (E) VEGF. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

织中分离了MSCs, 这些组织包括脐带、羊膜、绒毛膜平滑肌层、绒毛膜滋养层和蜕膜层(UC-MSCs、AM-MSCs、CM-MSCs、CV-MSCs和DC-MSCs), 比较了5种类型间充质干细胞的生物学特性和基因表达。

胎盘和脐带在分娩后常作为医疗废弃物丢弃, 提取的间充质干细胞则来源丰富, 且不会带给捐赠者不适, 无伦理限制, 免疫原性低,

因而被认为是再生医学的候选细胞, 在细胞疗法和组织工程中受到关注。本研究中, 对脐带和胎盘不同层次的5种类型的MSCs细胞进行形态观察, 发现它们形态相似, 呈成纤维细胞样, 融合生长时细胞呈旋涡状; 通过细胞鉴定发现所有来源的MSCs均表达相似的表面标记; 通过对其进行诱导分化, 发现5种类型MSCs均具有三系分化的潜能。此外, 我们对

源自胎盘组织的 5 种类型的 MSCs 进行了核型分析,发现它们的基因既有相似性也有所差异,分析发现 UC-MSCs、AM-MSCs、CM-MSCs 和 CV-MSCs 是从胎儿获得的,而 DC-MSCs 是从母体组织获得的。Chen 等^[30]比较了源自母体胎盘和沃顿氏胶的间充质干细胞的生物学特性,结果与我们相同。

基于转录组测序分析的比较,我们确定了人类胎盘和脐带来源的常见和特定基因。结果表明,来自脐带和胎盘的 hMSC 具有相似的基因表达模式,但也存在一些差异。AM-MSCs 与 UC-MSCs 的 KEGG 分析结果显示主要在 DNA 复制、ECM-受体相互作用、细胞衰老等方面有差异基因,CM-MSCs 与 UC-MSCs 的 KEGG 分析结果显示主要在吞噬体、PPAR 信号通路、类固醇激素的合成、补体、花生四烯酸代谢凋亡、p53 信号通路等方面有差异, CV-MSCs 与 UC-MSCs 的 KEGG 分析结果显示主要在类固醇激素的合成、抗原处理和展示、补体和凝血级联反应、造血细胞谱系、糖鞘脂的生物合成等方面有差异基因。这些特定基因参与细胞周期、细胞分裂、细胞死亡、细胞生长和发育。并且在 DNA 修复、DNA 复制和染色体稳定性中起作用。我们观察到,脐带来源的 MSCs 具有更强的增殖活力,转录组测序分析的结果在一定程度上解释了不同来源的 MSCs 之间生物学特性的差异。Teng 等^[19]的研究结果也显示了细胞在这些方面有差异。我们相信,这些特定的差异表达基因可以为研究生物标记及其相应功能提供线索,为以后脐带和胎盘来源的间充质干细胞的临床应用提供更多的机会,并且在未来疾病的治疗中有不同的优势。

针对转录组基因测序分析结果,我们从增殖能力和分泌细胞因子等方面对 5 种不同来源的 MSCs 进行了验证分析,进一步阐述了不同

来源 MSCs 的生物学特性的相似性与差异性。通过对这 5 种细胞的平均群体倍增时间 (PDT) 的分析可知,在同一培养条件下,脐带和胎盘不同层次的间充质干细胞具有不同的增殖能力,增殖速度由快到慢依次为 UC-MSCs、CM-MSCs、CV-MSCs、AM-MSCs、DC-MSCs。通过对 5 种不同的间充质干细胞分泌因子异同的比较可知,脐带来源 MSCs 和胎盘来源的 MSCs 分泌的旁分泌细胞因子是不同的,与 AM-MSCs、CM-MSCs 和 DC-MSCs 相比, CV-MSCs 和 UC-MSCs 分泌更高水平的多种旁分泌因子,因此我们推测, CV-MSCs 和 UC-MSCs 可能更适合用于治疗其他疾病的细胞疗法,未来可能根据分泌因子的高低针对不同的疾病选择不同来源的胎盘间充质干细胞。

REFERENCES

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 2005, 33(11): 1402-1416.
- [3] In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1338-1345.
- [4] Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*, 2013, 19(1): 35-42.
- [5] Oktay K, Oktem O. Regeneration of oocytes after chemotherapy: connecting the evidence from mouse to human. *J Clin Oncol*, 2007, 25(22): 3185-3187.
- [6] Nazarov I, Lee JW, Soupene E, et al. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(5): 359-372.
- [7] Kim HS, Shin TH, Lee BC, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 signaling to COX2.

- Gastroenterology, 2013, 145(6): 1392-1403.e8.
- [8] Makhoul G, Chiu RC, Cecere R. Placental mesenchymal stem cells: a unique source for cellular cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 2013, 95(5): 1827-1833.
- [9] Wang H, Chen L, Liu Y, et al. Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure through immunomodulation. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4912-4921.
- [10] Hocum Stone LL, Xiao F, Rotschafer J, et al. Amelioration of ischemic brain injury in rats with human umbilical cord blood stem cells: mechanisms of action. *Cell Transplant*, 2016, 25(8): 1473-1488.
- [11] Zhu Y, Yang Y, Zhang Y, et al. Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 48.
- [12] Jung J, Choi JH, Lee Y, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl₄-injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *Stem Cells*, 2013, 31(8): 1584-1596.
- [13] Pischiutta F, Sammali E, Parolini O, et al. Placenta-derived cells for acute brain injury. *Cell Transplant*, 2018, 27(1): 151-167.
- [14] Yao X, Guo Y, Wang Q, et al. The paracrine effect of transplanted human amniotic epithelial cells on ovarian function improvement in a mouse model of chemotherapy-induced primary ovarian insufficiency. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4148923.
- [15] Kim MJ, Shin KS, Jeon JH, et al. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. *Cell Tissue Res*, 2011, 346(1): 53-64.
- [16] González PL, Carvajal C, Cuenca J, et al. Chorion mesenchymal stem cells show superior differentiation, immunosuppressive, and angiogenic potentials in comparison with haploidentical maternal placental cells. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(10): 1109-1121.
- [17] Ma J, Wu J, Han L, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane, umbilical cord, and chorionic plate under serum-free condition. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 19.
- [18] Wegmeyer H, Bröske AM, Leddin M, et al. Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(19): 2606-2618.
- [19] Teng SW, Lo YS, Liu WT, et al. A genome-wide comparison of mesenchymal stem cells derived from human placenta and umbilical cord. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017, 56(5): 664-671.
- [20] Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 1963, 197(4866): 452-454.
- [21] Nakao N, Nakayama T, Yahata T, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol*. 2010, 177(2): 547-554.
- [22] Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 2009, 88(9): 792-806.
- [23] 苗宗宁, 祝建中, 黄伟, 等. 体外分离培养胎盘多分化潜能细胞的实验研究. *中国微循环*, 2006, 10(1): 5-8, 73.
- [24] Miao ZN, Zhu JZ, Huang W, et al. The empirical study of isolation of multipotent cells from human term placenta *in vitro*. *J Chinese Microcirculation*, 2006, 10(1): 5-8, 73 (in Chinese).
- [25] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1330-1337.
- [26] Hou L, Cao H, Wang D, et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. *Int J Hematol*, 2003, 78(3): 256-261.
- [27] Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, et al. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod*, 2006, 74(3): 545-551.
- [28] Levy O, Kuai R, Siren EMJ, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci Adv*, 2020, 6(30): eaba6884.
- [29] Zhou T, Yuan Z, Weng J, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 24.
- [30] Ringdén O, Erkers T, Nava S, et al. Fetal membrane cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 2013, 31(3): 592-601.
- [31] Chen G, Yue A, Ruan Z, et al. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 228.

(本文责编 郝丽芳)