

杨嫣君,余飞,丁利军,等. 人脐带动脉旁、静脉旁与华通氏胶间充质干细胞的血管生成能力比较及移植安全性评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 43-53.

Yang YJ, Yu F, Ding LJ, et al. Comparison of angiogenesis ability and transplantation safety among mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein and Wharton's jelly [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 43-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.02.007

人脐带动脉旁、静脉旁与华通氏胶间充质干细胞的血管生成能力比较及移植安全性评价

杨嫣君^{1, 2}, 余 飞^{3*}, 丁利军^{4, 5}, 盛小强⁴, 孙海翔^{1, 4}

(1. 南京医科大学鼓楼临床医学院生殖医学中心, 南京 210008; 2. 常州市第一人民医院产科, 江苏 常州 213000;
3. 南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心, 南京 210008; 4. 南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心, 南京 210008;
5. 南京大学医学院附属鼓楼医院临床干细胞研究中心, 南京 210008)

【摘要】 目的 探讨人脐带动脉旁、静脉旁与华通氏胶间充质干细胞的血管生成能力及其生物安全性。
方法 分离培养人脐带动脉旁、静脉旁与华通氏胶间充质干细胞, 流式细胞仪鉴定表面标记物, 体外分化实验检测其多向分化潜能, 免疫荧光法检测血管旁细胞标记物, 体外成环检测三种干细胞的血管生成能力差异; 三种干细胞移植入 NOD-SCID 小鼠检测其生物安全性。
结果 三种干细胞表达间充质干细胞标记物, 具有多向分化潜能, 脐带动脉旁干细胞表达丰度更高的血管旁细胞标记物, 且体外血管生成能力更强; 三种干细胞移植后 3 月, 小鼠主要器官无明显形态学损伤与异常。
结论 人脐带动脉旁干细胞血管生成能力更强; 三种干细胞移植 NOD-SCID 小鼠无显著成瘤性, 安全可行。

【关键词】 脐带动脉旁干细胞; 血管生成; 生物安全性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 02-0043-11

Comparison of angiogenesis ability and transplantation safety among mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein and Wharton's jelly

YANG Yanjun^{1, 2}, YU Fei^{3*}, DING Lijun^{4, 5}, SHENG Xiaoqiang⁴, SUN Haixiang^{1, 4}

(1. Center for Reproductive Medicine, Drum Tower Clinic Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China.
2. Department of Gynecology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213000. 3. Experimental Animal Center, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008.
4.Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008. 5.Clinical Center for Stem Cell Research, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008)

【 Abstract 】 Objective To investigate and compare the angiogenesis ability and transplantation safety of mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein and Wharton's jelly. **Methods** We isolated and cultured human umbilical cord artery perivascular stem cells (UCA-PSCs), umbilical cord vein perivascular stem cells

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81801518); 江苏省科技计划(BE2018602)。

【作者简介】 杨嫣君(1993—)女, 硕士研究生, 研究方向: 妇产科学。E-mail: yyj1577421035@163.com

【通信作者】 余飞(1982—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: yufei0802@yeah.net

(UCV-PSCs) and Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs). Flow cytometry was used to analyze the expression of cell surface markers at passage 3. The multipotency of cells was analyzed by adipogenic, osteogenic and neural-like differentiation assays. Immunofluorescence was used to detect the perivascular stem cell markers. Angiogenesis ability was analyzed by tube formation assay. Stem cells were transplanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD-SCID) mice to test the biological safety. **Results** UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs expressed mesenchymal stem cell markers that showed multi-lineage differentiation potential. UCA-PSCs expressed perivascular stem cell markers and had stronger angiogenesis ability *in vitro* than UCV-PSCs and WJ-MSCs. At 3 months after cell transplantation, hematoxylin and eosin staining showed no obvious morphological damage or abnormality in the organs. **Conclusions** UCA-PSCs had stronger angiogenesis ability than UCV-PSCs and WJ-MSCs. The transplantation of three kinds of stem cells into NOD-SCID mice resulted in no tumor formation, and appeared to be safe and feasible.

[Keywords] human umbilical cord stem cells; angiogenesis; biosafety

干细胞在再生医学领域有巨大的应用潜能,通过干细胞移植、分化与组织再生,可发挥修复机体损伤的作用^[1]。其中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新和多系分化能力,在多种损伤性疾病治疗中具有较好的应用前景^[2]。MSCs 最早在骨髓中发现,现可从骨髓、外周血、脐带、胎盘、脂肪等多种组织中分离提取^[3-4]。而脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)来源于新生儿脐带,属于医疗废弃物,来源广泛,取材方便,具有较高安全性,低免疫原性,无伦理争议,体外增殖能力强等优势,在组织器官损伤修复应用方面有较好前景^[5]。组织损伤后, MSCs 可通过向病变部位迁移并增殖分化,直接参与损伤组织重建;其能旁分泌大量生长因子和细胞因子参与组织再生的调节;且其能刺激内皮细胞的分裂、迁移,有利于毛细血管内皮成熟及稳定,协调血管和神经生长,介导组织再生和重塑^[6]。

脐带中有两条脐动脉(UCA)和一条脐静脉(UCV),周围包裹华通氏胶。间充质干细胞可以从脐带的多个区域获得,包括脐动脉旁干细胞(perivascular stem cells derived from umbilical arteries, UCA-PSCs)、脐静脉旁干细胞(perivascular stem cells derived from umbilical vein, UCV-PSCs)和华通氏胶间充质干细胞(mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly, WJ-MSCs)^[7]。研究表明,大部分 MSCs 来源于组织的血管周围,血管周围分布有血管旁细胞(pericytes),其表达 MSCs 标记物且有多向分化潜能,是 MSCs 的祖细胞^[8]。来自不同解剖位置的间充质干细胞群具有转录组学差异且体内分化潜力不同^[9]。研究表明, WJ-MSCs 移植小鼠未见明显毒性反应,异种移植安全可行^[10],但未有 UCA-PSCs 与 UCV-PSCs

移植到小鼠体内的安全性研究。因此本研究旨在从脐带不同组分即脐动、静脉旁及华通氏胶中分离、培养间充质干细胞,并对其进行扩增、鉴定,比较三种干细胞的生物学特性及血管生成能力的差异,并通过尾静脉输注和腹股沟皮下注射,检测干细胞移植后小鼠的脏器是否成瘤探讨其安全性,为脐带间充质干细胞在组织损伤修复中的进一步临床应用及筛选最优质的种子细胞提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 NOD-SCID 雌鼠 60 只,鼠龄 6 周,体重 18~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],饲养于鼓楼医院动物实验中心屏障环境[SYXK(苏)2014-0052]。采用 12 h/12 h 明/暗光照周期(06:00~18:00),温度 22℃,自由饮水和摄食。无菌手术在屏障内实验室进行,操作遵守江苏省实验动物管理条例和动物福利伦理原则。伦理审批号(2018010016),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 材料

脐带取自于南京鼓楼医院产科足月顺产新生儿废弃的脐带组织,产妇知情同意。伦理审批号(SC201800101)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM-LG、bFGF、FBS(美国 Gibco 公司);青链霉素、非必需氨基酸、全反式视黄酸(美国 HyClone 公司);成脂诱导培养基(Adipogenic Differentiation Kit, Gibco)、成骨分化培养基(Osteogenic Differentiation Kit, Gibco)、茜素红粉末(美国 Gibco 公司);油红 O 粉末、丙戊酸、丁羟基茴香醚、

forskolin(德国 Sigma 公司);FITC-CD13 抗体、FITC-CD29 抗体、FITC-CD45 抗体、FITC-CD90 抗体、PE-CD105 抗体、HLA-DR 抗体(美国 ebioscience 公司);FITC-CD34 抗体、FITC-CD73 抗体、PE-CD146 抗体(美国 BD 公司);NSE 抗体、NF-M 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司);CD146(ab24577)、PDGFR β (ab32570)、NG2(ab139406)、 α -SMA(ab5694)、荧光标记二抗 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488)(ab150113)和 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor[®] 594)(ab150088)(英国 Abcam 公司);苏木素及伊红(北京天合力恩化学试剂公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 5400);流式细胞仪(美国 BD FACS Calibur);荧光显微镜(德国 Leica DMR);倒置显微镜(德国 Leica DMIL)。

1.3 实验方法

1.3.1 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 的原代分离与培养^[11]

取新鲜人脐带 7~8 cm,4 h 内用 PBS(含 10% 青链双抗)冰上运输,超净台内 PBS 冲洗,剪刀修齐两断面,沿脐带内血管长轴方向剪开脐带,用镊子钝性分离脐带动脉和静脉,仔细剔除血管外膜周围紧贴血管的华通氏胶组织。将脐带动脉、静脉、华通氏胶用 PBS 洗涤 1 次后,剪碎至 1~2 mm³ 大小组织块,组织块接种于 100 mm 细胞培养皿,放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内 4 h。然后缓慢加入 5 mL DMEM-LG 培养基至 100 mm 皿中,置于培养箱。第一周第 3 天和第 7 天各加 DMEM-LG 培养基 3 mL、2 mL,之后第二周半量换液 2 次,之后第三周全量换液 2 次,期间观察贴壁细胞爬出情况。3 周后细胞长到 80% 融合时去除组织块,0.05% 胰酶消化,传代培养。取 P3~P5 代细胞用于实验。

1.3.2 细胞表面分子标记物鉴定

取 P3 代细胞,0.05% 胰酶消化后制成单细胞悬液,1200 r/min,离心 4 min 后弃上清,PBS 重悬。每 100 μ L 细胞悬液中含 1×10^5 细胞,分别加入 FITC 标记和 PE 标记的 CD13、CD29、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、CD146 与 HLA-DR 抗体,避光孵育 30 min。1200 r/min,离心 4 min 后弃上清,500 μ L PBS 重悬,流式细胞仪检测,Flowjo 10 软件分析结果。

1.3.3 体外诱导分化

(1)成脂诱导

取 P3 代细胞以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于 24 孔板,每孔加 500 μ L DMEM-LG 培养基,培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱。细胞汇合后换液,对照组 3 孔换完全培养基,成脂诱导组 3 孔更换成脂诱导培养基,每 3 天换液,显微镜密切观察细胞生长情况及形态变化。第 21 天后细胞中可见脂肪滴,终止诱导并弃去培液,PBS 洗 3 次,每次 5 min。室温下 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,500 μ L 油红 O 染液孵育 10 min。弃去油红 O 染色液,PBS 洗 3 次,每次 5 min,空气干燥,镜下观察拍照。

(2)成骨诱导

取质量分数 0.1% 明胶 500 μ L 平铺于 24 孔板,静置 30 min,弃去明胶后,取 P3 代细胞,以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于 24 孔板,每孔加入 500 μ L DMEM-LG 培养基,置于 37℃,体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞汇合后换液,对照组 3 孔换完全培养基,成骨诱导组 3 孔换成骨分化培养基,每 3 天换液,显微镜密切观察各孔中细胞的生长状态及形态学改变。3~4 周后用茜素红染液染色,弃去培液,室温下 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,500 μ L 2% 茜素红染液孵育 20 min。弃去茜素红染色液,PBS 洗 3 次,每次 5 min。空气干燥,镜下观察拍照。

(3)成神经诱导

P3 代细胞以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 24 孔板中(预先放置经 L-多聚赖氨酸处理过的无菌玻片)。添加成神经预诱导液 500 μ L,预诱导 24 h 后弃液,PBS 洗 2 次,每次 5 min,换成神经分化诱导液 500 μ L,24 h 后加入 ATRA (10^{-7} M)和 bFGF (10 ng/mL)以维持神经元诱导分化。镜下观察细胞生长状态及形态变化,第 7 天后出现明显细胞突触时,终止诱导,细胞免疫荧光鉴定神经元特异性标志物 NSE、NF-M。弃去培液,每孔加预冷的 PBS 500 μ L 清洗 3 次,每次 5 min,吸尽残液。每孔加 4% 多聚甲醛 500 μ L 室温固定 20 min。每孔加 PBS 1 mL 清洗 3 次,每次 5 min。每孔加含 0.5% TRITON X-100 的 PBS 500 μ L,室温孵育细胞 5 min。每孔加含 1% BSA 的 PBS 500 μ L 洗 3 次,每次 5 min。每孔加含 3% BSA、0.1% TRITON X-100 的 PBS 500 μ L,37℃ 孵育 45 min。按 1:100 稀释一抗 NSE(sc-292097,1:100),NF-M(sc-16143,1:100)抗体,阴性对照一抗为 PBS,4℃ 孵育过夜,每孔加含 1% BSA 的 PBS 500 μ L 清洗 3 次,每次 5 min。1:200 稀释

荧光二抗。每孔加入二抗稀释液 200 μL , 37℃ 避光孵育 60 min。每孔加 PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 500 μL 避光洗 3 次, 每次 5 min。PBST 按 1:10000 稀释 DAPI, 每孔加入稀释后的 DAPI 200 μL , 室温避光孵育 5 min。每孔加 PBST 500 μL 避光清洗 3 次, 每次 5 min。载玻片上滴加抗荧光淬灭剂, 封片、固定, 荧光显微镜镜下观察 NSE 和 NF-M。

1.3.4 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 血管旁细胞标记物检测

取 P3 代的 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 铺于 24 孔板中 (预先放置 L-多聚赖氨酸处理的无菌玻片), 培养 24 h 后, 细胞免疫荧光检测相关标志物。利用 CD146 (1:1000) 与 PDGFR β (1:100), NG2 (1:500), α -SMA (1:500) 双标记免疫荧光染色, 4℃ 过夜后去除一抗, 每孔加 1% BSA 的 PBS 500 μL 清洗 3 次, 每次 5 min。含 1% BSA、0.1% TRITON X-100 的 PBS 按 1:200 稀释荧光二抗。每孔加入荧光标记二抗 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (1:200), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (1:200) 200 μL , 37℃ 避光孵育 60 min。荧光显微镜观察。

1.3.5 体外成环实验

96 孔板中每孔加入 50 μL Matrigel 基质胶, 放入培养箱中, 静置 30 min, 等待凝胶凝结。取 P3 代的 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs, 每孔分别加 5×10^3 的相应干细胞与 5×10^3 的脐带静脉内皮细胞 (HUVECs), 共同接种于凝胶上培养。含 0.3 nmol/L 的 VEGF 作为阳性对照组。3 h 后观察血管形成情况, 每孔随机选取 6 个区域, 计数形成的血管环数, 分支点及管长度并拍照。

1.3.6 实验动物分组

60 只小鼠称量体重, 按体重大小排序从 1 到 60 号, 由计算机随机产生 60 个随机数字, 根据随机数字将小鼠分为阴性对照组、UCA-PSCs 移植组、UCV-PSCs 移植组、WJ-MSCs 移植组和阳性对照组, 每组 12 只。计数各组小鼠体重且体重均数间无统计学差异。干细胞移植组半数小鼠经尾静脉注射含 5×10^6 第三代相应干细胞的 PBS 悬液 10 mL, 半数小鼠腹股沟皮下注射含 1×10^7 第 3 代相应干细胞的 PBS 悬液 10 mL, 阴性对照组每次注射等体积的 PBS, 阳性对照组腹股沟注射 1×10^7 的人胚胎干细胞。12 周后经过病理检查, 观察腹腔器官有无异常。取各脏器, 石蜡包埋后切片, 并做 H&E 染色。

显微镜下观察组织病理变化以评估三种干细胞移植的生物安全性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 (Version 19.0, IBM Corp., Armonk, NY) 进行数据分析处理。定量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脐带动脉旁、静脉旁和华通氏胶间充质干细胞形态学观察

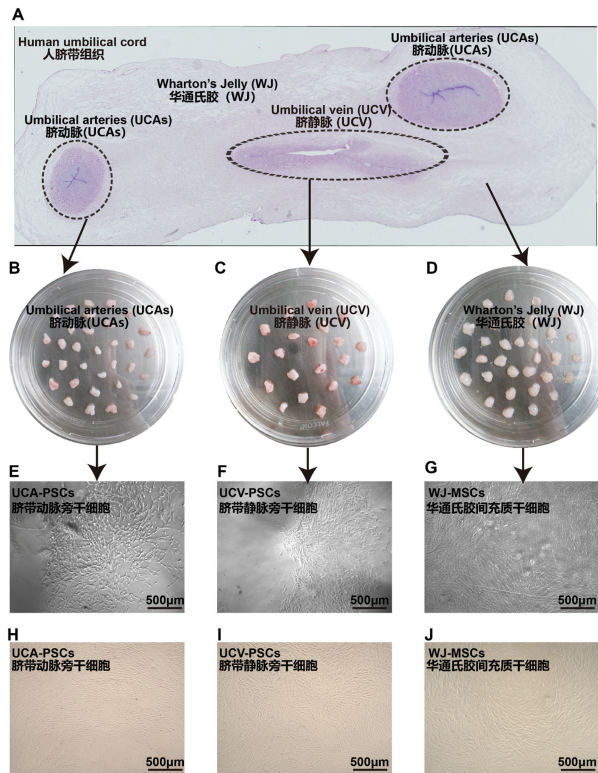
脐带中有 2 条脐动脉, 1 条脐静脉, 螺旋走行, 之间环绕着华通氏胶 (图 1A)。将脐动脉、脐静脉、华通氏胶从脐带中机械分离, 组织贴壁法分离 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs, 培养约 7 d 可见少量细胞呈放射状从贴壁组织块爬出, 呈长梭形且增殖迅速 (图 1B-J)。

2.2 脐带动脉旁、静脉旁和华通氏胶间充质干细胞表面标记物鉴定

取 P3 代人 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 流式分析其表面标记物, 如图 2, UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 均高表达 CD13、CD29、CD73、CD90、CD105, 不表达或低表达 CD34、CD45、HLA-DR。其中 CD13、CD29、CD90、CD44、CD105 都是间充质干细胞特异性的表面标记, 而 CD34、CD45 是淋巴细胞和造血干细胞的表面标记分子^[12]。CD146 在 UCA-PSCs 中表达最高, 其次是 UCV-PSCs, 在 WJ-MSCs 中表达最少 (图 2A-Z')。

2.3 脐带动脉旁、静脉旁和华通氏胶间充质干细胞的体外诱导分化

已有文献报道, 脐带间充质干细胞可分化为成骨细胞、脂肪细胞和类神经元细胞^[13]。为了探讨分离的细胞具有多向分化潜能, 取第 3 代 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs, 进行体外诱导分化为骨细胞、脂肪细胞以及类神经元细胞。成脂诱导后, 细胞形态由长梭形变成圆形, 在诱导第 12 天, UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 细胞内开始出现圆形脂滴, 有的相互融合, 形成较大的脂滴。在诱导第 14 天, 油红 O 染色显示大小不等的红色脂滴 (图 3A-C)。细胞经成骨诱导后由长梭形变成片状结构, 细胞外基质开始沉积。诱导 10 d 后, 细胞中出现骨性结节, 至第 21 天左右时, 细胞形态以多角形为主, 中央可见类似结节



注:A:人脐带大体示意图;B-D:脐动脉、脐静脉、华通氏胶组织块;E-G:人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞从组织块中爬出;H-J:人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞呈梭形,螺旋状生长。

图 1 分离培养人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞
Note. A, Human umbilical cord (UC). B-D, Human umbilical cord arteries (UCA), umbilical cord vein (UCV) and Wharton's jelly (WJ). E-G, Isolation of umbilical cord artery perivascular stem cells (UCA-PSCs), umbilical cord vein perivascular stem cells (UCV-PSCs) and Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs). H-J, Cells at the third passage showed fibroblastic morphology.

Figure 1 Isolation and culture of UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs

状结构。茜素红染色后,可见细胞中间有钙化结节出现(图 3D-F)。预诱导液诱导后,少数细胞可见隆状突起。24 h 后更换为成神经诱导液,诱导 1 h 后部分细胞开始凋亡,可见细胞形态逐渐成为星状,互相连接,形态具有神经样特征,折光性增强。细胞免疫荧光结果显示:UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 经诱导后表达神经元特异性烯醇化酶 NSE(图 3G-I)以及神经丝 NF-M(图 3J-L),表现神经样细胞的特征。诱导分化结果表明 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 均具有多向分化潜能。

2.4 脐带动脉旁干细胞中 PDGFRβ、NG2、α-SMA 与 CD146 的表达情况

通过双重标记 CD146、PDGFRβ、NG2 与 α-SMA

的方法标记血管旁细胞^[14],本研究中,UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 在体外扩增后,通过免疫荧光双重标记 CD146 与 PDGFRβ,可观察到 UCA-PSCs 在体外扩增后能表达 CD146 与 PDGFRβ,而 UCV-PSCs 也能表达较弱的 CD146 与 PDGFRβ 信号,但是 WJ-MSCs 基本不表达 CD146 与 PDGFRβ(图 4A-C),而 CD146 与 NG2,CD146 与 α-SMA 荧光双重标记结果也表明 UCA-PSCs 表达更多的血管旁细胞的标记物(图 4D-I)。

2.5 脐带动脉旁干细胞体外血管形成能力较强

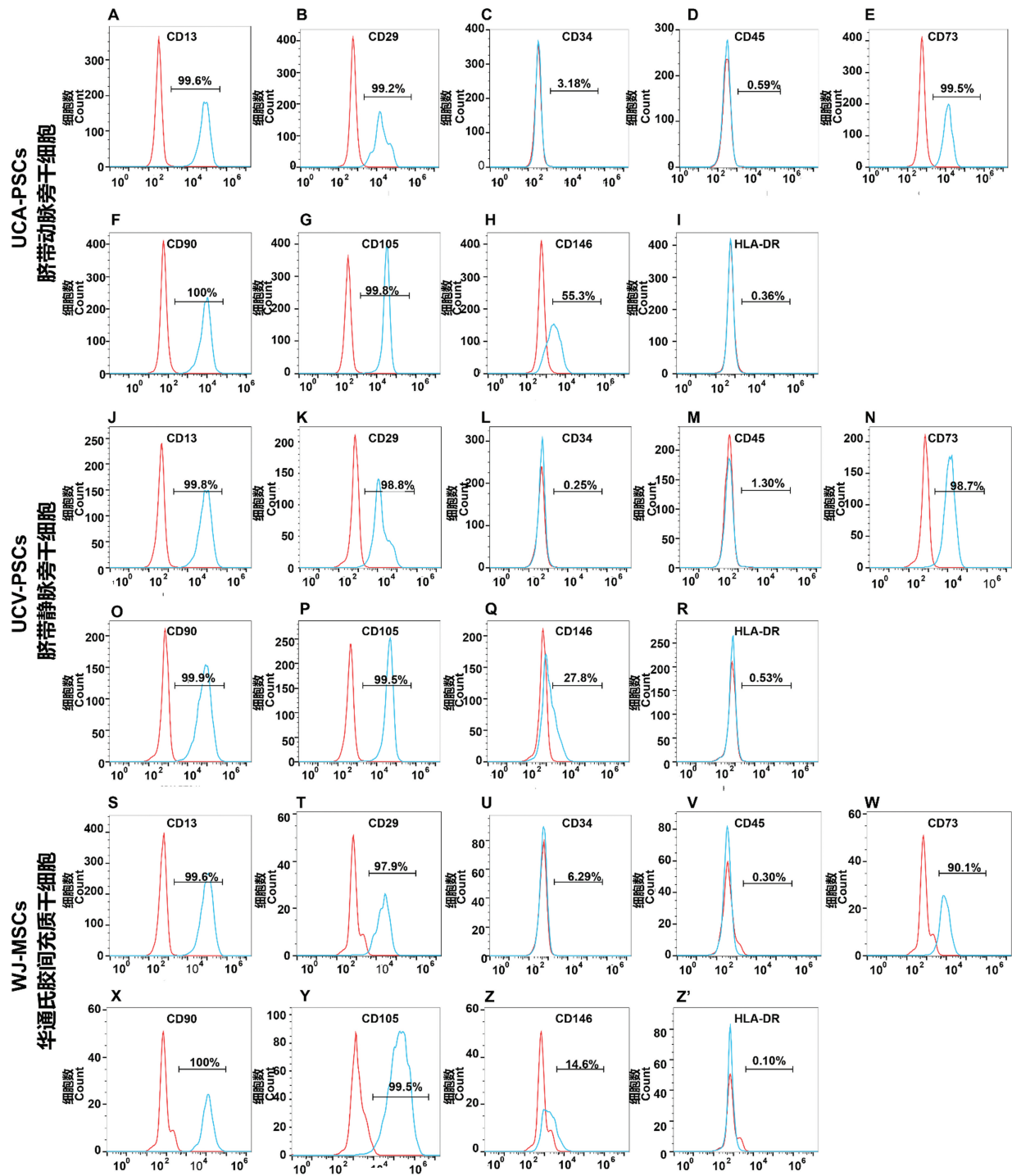
体外成环实验显示:UCA-PSCs 与 HUVEC 共培养,种植于 matrigel 基质胶 3 h 后成环形成大量树枝状的血管环数,多于 UCV-PSCs 组的血管成环数目,WJ-MSCs 组 HUVEC 体外成环稀少(图 5A-C)。随机选取 6 个高倍镜(100 倍)量化血管环数,结果显示,UCA-PSCs+HUVEC 组($17.5 \pm 1.48, n=6$)环状结构数目多于 UCV-PSCs + HUVEC 组($13.83 \pm 0.70, n=6, P<0.05$),显著多于 WJ-MSCs+HUVEC 组($8 \pm 1.29, n=6, P<0.001$)。分支点数统计结果显示,UCA-PSCs+HUVEC 组($15 \pm 1.16, n=6$)显著多于 WJ-MSCs+HUVEC 组($7 \pm 1.73, n=6, P<0.05$),较 UCV-PSCs + HUVEC 组($11.33 \pm 1.86, n=6, P>0.05$)未明显增加。与 WJ-MSCs+HUVEC 组[(100 ± 0)%, $n=6$]相比,UCA-PSCs+HUVEC 组[(185 ± 7.64)%, $n=6, P<0.01$]与 UCV-PSCs + HUVEC 组[(146.3 ± 12.81)%, $n=6, P<0.05$]管长度显著增加(图 5D-F)。以上结果提示,脐带动脉旁、静脉旁干细胞尤其是前者的血管形成能力明显优于华通氏胶间充质干细胞。

2.6 脐带动脉旁、静脉旁和华通氏胶间充质干细胞移植后脏器形态学观察

NOD-SCID 小鼠经 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 静脉输注和腹股沟移植 12 周后,进行病理检查,解剖大体观,均未发生结节或肿瘤形成,心、肝、脾、肺、肾、肌肉等脏器均未见明显异常,HE 染色均未见明显淋巴细胞浸润、坏死现象(图 6A-R)(图 7A-R)。阳性对照组 NOD-SCID 小鼠经胚胎干细胞腹股沟移植后可见直径约 1 cm 大小的畸胎瘤形成(图 8A-B),以及三胚层细胞分化(图 8C-F)。

3 讨论

本研究发现 UCA-PSCs 较 UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 具有更强的促血管生成能力,且 UCA-PSCs、

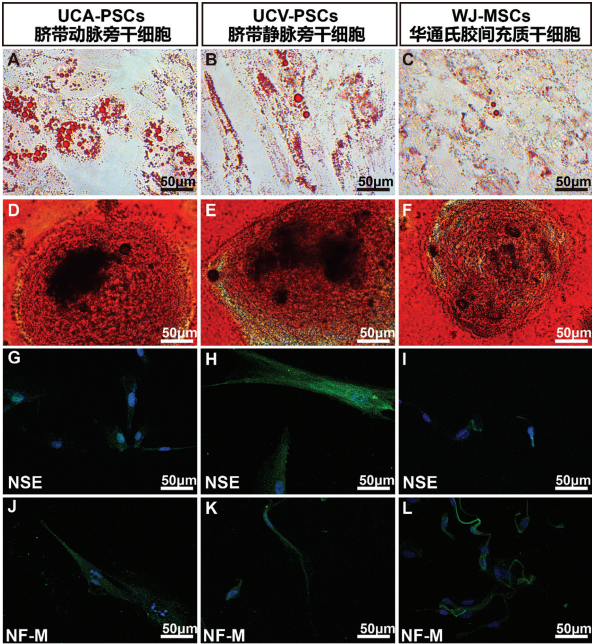


注:A-Z': 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞均高表达 CD13、CD29、CD73、CD90、CD105,不表达或低表达 CD34、CD45、HLA-DR,CD146 在脐带动脉旁干细胞中表达最高,其次是脐带静脉旁干细胞,在华通氏胶间充质干细胞中表达最少。

图 2 流式分析检测脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞的细胞表面标志物
Note. A-Z', UCA-PSCs, UCV-PSCs, and WJ-MSCs were positive for CD13, CD29, CD73, CD90, CD105, negative for CD34, CD45 and HLA-DR. The expression of CD146 in UCA-PSCs was higher than UCV-PSCs and WJ-MSCs.

Figure 2 Flow cytometry analysis of UCA-PSCs, UCV-PSCs, and WJ-MSCs surface markers

UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 华通氏胶间充质干细胞移植入 NOD-SCID 小鼠安全可靠,提示其可进一步应用于间充质干细胞移植修复。间充质干细胞移植在组织损伤及随后的再生修复相关的多种疾病具有治疗价值^[15]。研究表明,MSCs 移植在脊髓损伤、心肌缺血和糖尿病视网膜病变中有较佳的疗效^[16-18]。



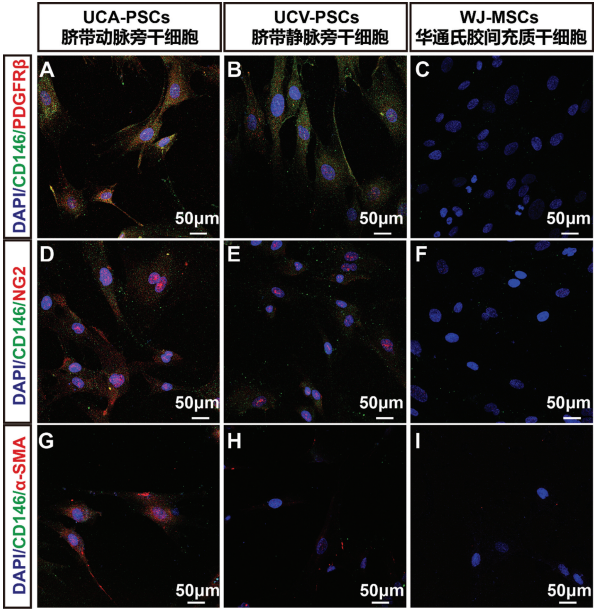
注:A-C:UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 成脂肪诱导后可见圆形脂滴,油红 O 染色示细胞内红色脂滴;D-F:UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 成骨诱导后,光镜下可见钙沉积呈类结节状,茜素红染色后可见钙沉积;G-I:UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 成神经诱导后细胞形成突起,表达神经丝 NSE;J-L:UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 成神经诱导后细胞形成突起,表达神经丝 NF-M。

图 3 人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞体外诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞和类神经元细胞

Note. A-C, For adipogenic differentiation, UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs were cultured in adipogenic induction medium for 14 d. The formation of lipid droplets was confirmed by Oil Red O staining. D-F, UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs were cultured in osteogenic supplemented (OS) medium for 28 d. Calcium deposition was confirmed by Alizarin red staining. G-L, Differentiation of UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs to neuronal lineage after 24 h pre-induction and 36 h induction was confirmed by immunofluorescence staining of neuron-specific enolase and neurofilament medium polypeptide.

Figure 3 The differentiation of UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs

MSCs 通过分泌各种免疫调节细胞因子,干扰 T 细胞和树突细胞功能,局部免疫抑制,发挥修复作用^[19]。此外, MSCs 通过分泌促血管生成因子促进血管生成,胎盘绒毛膜间充质干细胞具有分泌血管生成因子能力,包括血管内皮生长因子(VEGF)和肝细胞生长因子(HGF),可改善小鼠缺血下肢的功能^[20];临床研究也表明, MSCs 移植入缺血梗死心肌后,心肌功能得到改善^[21];这些研究提示 MSCs 分



注:A-C:人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的 CD146 与 PDGFRβ 的表达情况;D-F:人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的 CD146 与 NG2 的表达情况;G-I:人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的 CD146 与 α-SMA 的表达情况。

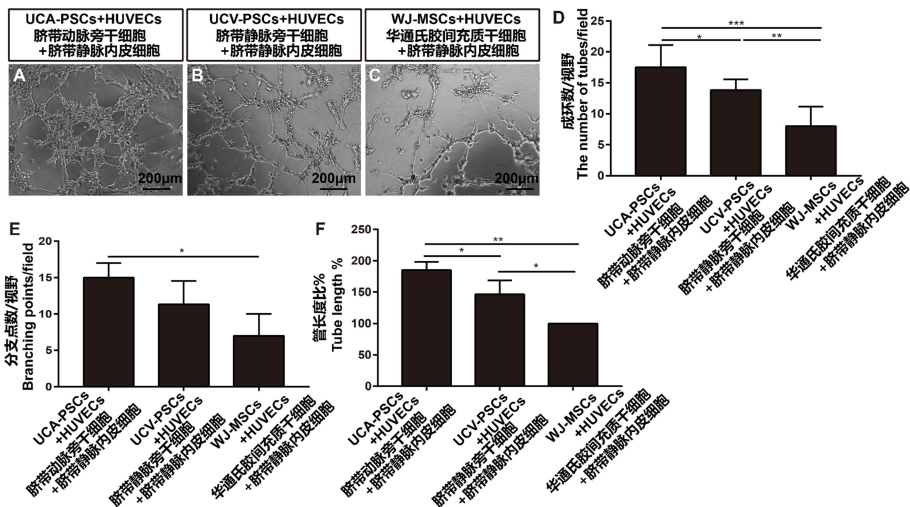
图 4 人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的血管旁标记物检测

Note. A-C, Representative images of co-staining for the CD146/PDGFR-β in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs. D-F, Representative images of co-staining for the CD146/NG2 in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs. G-I, Representative images of co-staining for the CD146/α-SMA in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs.

Figure 4 The perivascular markers of UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs

泌的促血管生成因子可以刺激血管生成并增加局部灌注,有利于组织再生。

研究表明,起源于不同组织和位置的 MSCs 具有不同的功能特性,间充质祖细胞可从血管周围分离,具有血管旁细胞定位和分子标记物表达鉴定^[22]。最新研究表明血管周围的血管旁细胞(pericyte)是 MSCs 的前体,维持血管的结构完整性和发育及组织稳态^[23]。血管生成的速度与质量是损伤修复关键因素,损伤组织必须从血液供应中获取足够的养分及氧气,保证细胞迁移、增殖和分化^[24]。血管由内皮细胞和外部的血管旁细胞组成^[25]。多种来源的 MSCs 除了分化为内皮细胞外,还可通过旁分泌血管生成因子,与内皮细胞相互作用以促进血管生成^[26]。以往的研究报道人脐带华通氏胶间充质细胞处于缺乏毛细血管的疏松结缔

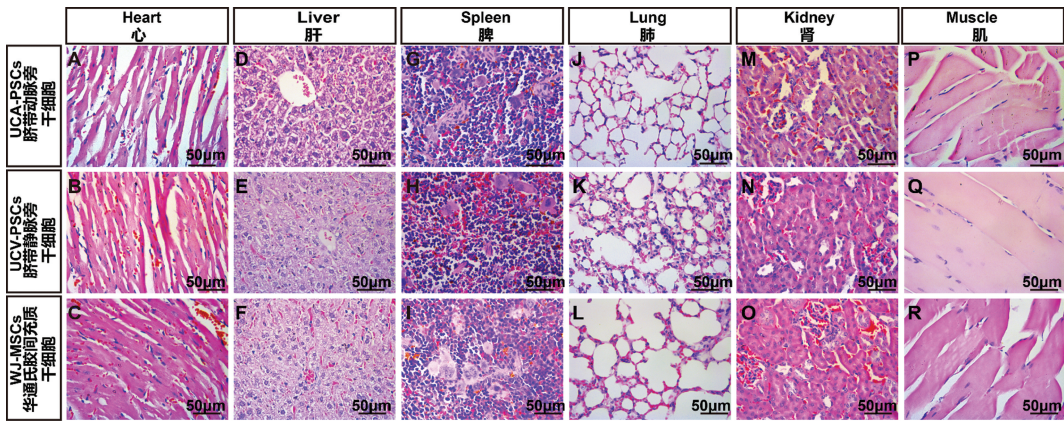


注:A-C: 人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞与 HUVEC 共培养 3 h 促成环管;D-F: 人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的血管环数,分支点与管长度统计。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

图 5 人脐带动脉旁、静脉旁、华通氏胶间充质干细胞的体外成环实验

Note. A-C, UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs were cultured with HUVEC plating on Matrigel in 96-well tissue culture plates. D-F, The number of tubes, branching point per field and the total length of tubes per field were quantified 3 h after treatment by counting 6 random fields/well under the microscope. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Figure 5 In vitro matrigel tube formation assay of UCA-MSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs



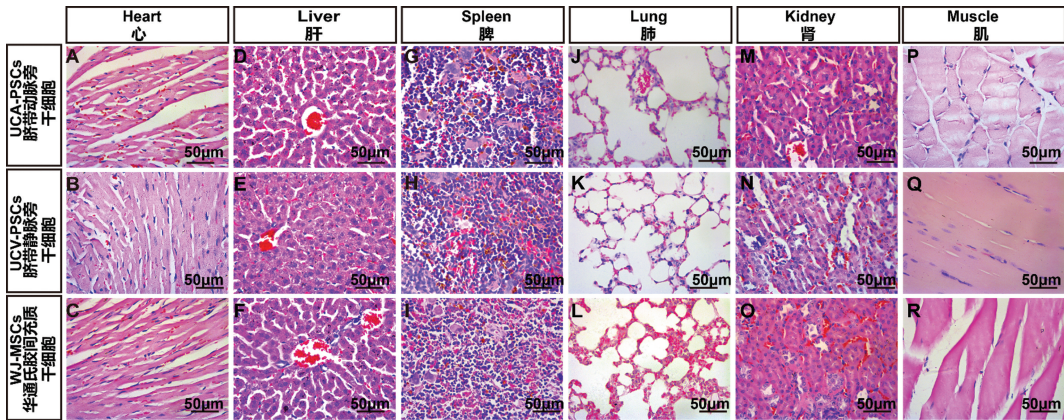
注:A-C: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的心肌 H&E 染色;D-F: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肝 H&E 染色;G-I: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的脾 H&E 染色;J-L: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肺 H&E 染色;M-O: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肾 H&E 染色;P-R: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肌肉 H&E 染色。

图 6 NOD-SCID 小鼠静脉输注干细胞后器官 H&E 染色

Note. A-C, The H&E staining of heart showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. D-F, The H&E staining of liver showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. G-I, The H&E staining of spleen showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. J-L, The H&E staining of lung showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. M-O, The H&E staining of kidney showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. P-R, The H&E staining of muscle showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups.

Figure 6 The H&E staining of organs in NOD-SCID mice with intravenous injection of cells

组织中,旁分泌血管生成因子较少,血管生成能力低下^[27]。在本研究中,通过体外血管环化实验和细胞迁移侵袭实验发现 UCA-PSCs、UCV-PSCs 和 WJ-MSCs 促进体外血管生成能力不同。UCA-PSCs 促

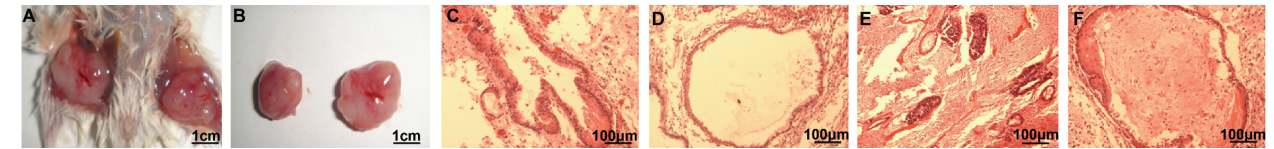


注:A-C: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的心肌 H&E 染色;D-F: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肝 H&E 染色;G-I: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的脾 H&E 染色;J-L: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肺 H&E 染色;M-O: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肾 H&E 染色;P-R: 脐带动脉旁干细胞、脐带静脉旁干细胞与华通氏胶间充质干细胞组的肌肉 H&E 染色。

图 7 NOD-SCID 小鼠腹股沟皮下移植干细胞后器官 H&E 染色

Note. A-C, The H&E staining of heart showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. D-F, The H&E staining of liver showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. G-I, The H&E staining of spleen showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. J-L, The H&E staining of lung showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. M-O, The H&E staining of kidney showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups. P-R, The H&E staining of muscle showed no significant pathologic changes in UCA-PSCs, UCV-PSCs and WJ-MSCs groups.

Figure 7 The H&E staining of organs in NOD-SCID mice with transplantation of cells through the skin in the inguinal region



注:A-B: 人胚胎干细胞移植入 NOD-SCID 小鼠腹股沟观察成瘤;C-D: 病理观察可见内胚层的腺管和腔上皮;E: 病理观察可见外胚层的神经组织;F: 病理观察可见中胚层的软骨组织。

图 8 人胚胎干细胞腹股沟皮下移植 NOD-SCID 小鼠成瘤实验

Note. A-B, The transplantation of human embryonic stem cells generated tumor in NOD-SCID mice. C-F, there were three embryonic tissue layers in NOD-SCID mice.

Figure 8 The transplantation of human embryonic stem cells to NOD-SCID mice

HUVEC 成环和迁移能力皆优于 UCV-PSCs 和 WJ-MSCs。通过双重标记 CD146、PDGF-R β 、NG2 与 α -SMA 的方法从组织定位血管旁细胞^[14], 本研究中, UCA-PSCs 在体外扩增后仍能表达特定的血管旁细胞表面标记物 CD146、PDGF-R β 、NG2 与 α -SMA, 表明 UCA-PSCs 具有更强的体外血管生成能力。

间充质干细胞的应用涉及体外扩增培养和体内注射治疗两个阶段, 其作为组织修复的巨大潜能种子细胞已应用于多项临床试验, 但其安全性引起了极大重视。有研究表明, 体外扩增的 MSCs 在移植后可能会发生不良性转化, 存在肿瘤发生的潜在风险。人脂肪间充质干细胞 (adipose tissue-derived

mesenchymal stem cells, Ad-MSCs) 在体外长期培养 8~10 周后, 端粒酶活性及细胞周期相关基因失去调节, 发生少量染色体畸变^[28]; 小鼠骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 在体外长期培养后, c-Myc 表达增加, 且端粒酶活性上调^[29]。分化能力检测是 MSCs 特异性的分析方法, 随着体外培养时间增加, MSCs 分化能力降低, 分化成组织细胞种类减少, 分化成特定组织细胞的比例降低^[30]。本研究中, UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 从脐带中分离获得足量细胞, 体外传代 3~5 次应用于实验, 以避免长期培养导致的潜在染色体异常, 且其体外具有多向分化潜能, 分化能力

正常。尽管 MSCs 显示出正常的形态学特征和表面标志物,但在体内注射时可能发生染色体异常并发生不良性转化,所以体内成瘤实验是检测 MSCs 发生不良性转化的可靠方法^[31]。研究表明,利用 WJ-MSCs 移植入动物体内可治疗多种动物疾病模型,且移植方法安全有效。猪慢性缺血性心肌病模型经冠状动脉移植 WJ-MSCs 后无冠状动脉栓塞等风险,促进心肌再生,改善心功能^[32]。兔慢性输卵管炎模型经静脉注射 WJ-MSCs 后,其迁移至受损输卵管,促进输卵管上皮细胞再生^[33]。WJ-MSCs 移植入裸鼠体内安全有效^[34],但尚无脐带多种来源间充质干细胞的安全性评价研究,因此为了评估 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 的移植安全性问题,我们使用 NOD-SCID 小鼠进行了干细胞体内移植实验,将 P3 代 UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 经腹股沟移植或尾静脉注射的方式移植入小鼠体内,移植后三个月未观察到肿瘤形成,多器官组织病理学未发现显著的病理变化。

我们的研究发现,UCA-PSCs、UCV-PSCs 与 WJ-MSCs 经静脉注射和腹股沟移植都是安全可行的,经静脉注射 MSCs 可通过外周免疫调节作用且在炎症信号引导下经血流迁移到受损区域,减少了迁移至受损区域的细胞数量^[35]。而干细胞皮下移植将其可能的免疫调节和营养作用直接集中在受损部位上,而不会产生全身性副作用^[36]。但何种移植方式对于干细胞治疗疾病更有效尚需讨论。

参考文献:

- [1] 张梅,王跃新,侯晓华,等. BcL-2 基因修饰神经干细胞移植修复大鼠脊髓损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 35-41.
- [2] 韩海燕,宋文广,刘锦,等. 人羊膜间充质干细胞移植后慢性酒精性肝损伤大鼠血生化指标含量的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 49-54.
- [3] Caplan AI. MSCs: The sentinel and safe-guards of injury [J]. J Cell Physiol, 2016, 231(7): 1413-1416.
- [4] Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review [J]. Stem Cell Rev Rep, 2018, 14(1): 1-12.
- [5] 董松,王鸿,雷蕾,等. 人脐带间充质干细胞经动脉介入治疗 2 型糖尿病 Beagle 犬的作用 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(22): 16-20.
- [6] Sacchetti B, Funari A, Remoli C, et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: human

committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels [J]. Stem Cell Reports, 2016, 6(6): 897-913.

- [7] Xu L, Zhou J, Liu J, et al. Different angiogenic potentials of mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein, and wharton's jelly [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 3175748.
- [8] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs [J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 301-313.
- [9] De Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, et al. Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related? [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(24): 1843-1852.
- [10] Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2517514.
- [11] 丁利军,孙海翔,徐璐. 一种脐带动脉和静脉血管周干细胞的制备和保存方法: ZL201610189133.7[P]. 2017-11-03.
- [12] Lin CS, Xin ZC, Dai J, et al. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges [J]. Histol Histopathol, 2013, 28(9): 1109-1116.
- [13] Cui X, Liu M, Wang J, et al. Electrospun scaffold containing TGF-beta1 promotes human mesenchymal stem cell differentiation towards a nucleus pulposus-like phenotype under hypoxia [J]. IET Nanobiotechnol, 2015, 9(2): 76-84.
- [14] Ahmed TA, El-Badri N. Pericytes: the role of multipotent stem cells in vascular maintenance and regenerative medicine [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1079: 69-86.
- [15] Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair [J]. Front Immunol, 2013, 4: 201.
- [16] 唐玺和,范益民,蓝胜勇. 细胞与生物材料联合治疗脊髓损伤的研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 127-130.
- [17] 李军,段班燕,王俊峰,等. 脐血干细胞移植治疗对缺血性心脏病患者左室重塑的影响 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(11): 69-72,76.
- [18] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts [J]. Aging Cell, 2008, 7(3): 335-343.
- [19] 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.
- [20] Du W, Li X, Chi Y, et al. VCAM-1⁺ placenta chorionic villi-derived mesenchymal stem cells display potent pro-angiogenic activity [J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 49.
- [21] Zhang X, Hirai M, Cantero S, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation

- and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(4): 1206–1218.
- [22] Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair [J]. *Acta Naturae*, 2011, 3(4): 30–37.
- [23] Xu L, Zhou J, Liu J, et al. Different angiogenic potentials of mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein, and wharton's jelly [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 3175748.
- [24] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 339–347.
- [25] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2012, 48(2): 75–83.
- [26] Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(2): e00191.
- [27] Mills SJ, Cowin AJ, Kaur P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process [J]. *Cells*, 2013, 2(3): 621–634.
- [28] Kim JM, Hong KS, Song WK, et al. Perivascular progenitor cells derived from human embryonic stem cells exhibit functional characteristics of pericytes and improve the retinal vasculature in a rodent model of diabetic retinopathy [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(9): 1268–1276.
- [29] Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3035–3039.
- [30] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 1095–1103.
- [31] 于文俊, 杨文华, 史哲新, 等. NOD/SCID 小鼠模型在实验血液学研究中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2008(5): 391–395.
- [32] 张宁坤, 陈宇, 王志国, 等. 华通胶源间充质干细胞经冠状动脉移植治疗慢性缺血性心肌病的实验研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(11): 885–891.
- [33] Li Z, Zhang Z, Ming WK, et al. Tracing GFP-labeled WJMSCs in vivo using a chronic salpingitis model: an animal experiment [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 272.
- [34] 韩丽鑫, 韩之波, 耿洁, 等. 脐带间充质干细胞对乳腺癌细胞系 MCF-7 裸鼠移植瘤生长的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(19): 2986–2992.
- [35] 何君, 李洋, 陈威, 等. 人脐带间充质干细胞静脉输注小鼠的安全性 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9): 36–41.
- [36] Zhao W, Li JJ, Cao DY, et al. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(10): 1048–1058.

[收稿日期] 2019-06-28