

体外诱导羊膜上皮细胞转分化为雌性生殖细胞的初步实验研究^{*}

王 飞¹, 刘小菁², 王 慧¹, 吴文超², 郑 艾^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 再生医学研究中心 心血管疾病研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 建立体外分离、培养人羊膜上皮细胞(hAECs)的方法,研究其向雌性生殖细胞转分化的潜能。**方法** 体外分离、培养并鉴定 hAECs 后,采用添加 5% 人卵泡液的培养基作为诱导剂,倒置显微镜下观察细胞形态的改变,化学发光免疫技术检测培养基中雌二醇(E₂)含量的变化,应用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)、Western blot 等方法检测雌性生殖细胞相关基因及蛋白表达水平的变化。**结果** 体外培养 hAECs 呈多角形,具有上皮细胞特有的铺路石样外观,并表达其特异性细胞角蛋白 19(CK19),同时能表达胚胎干细胞(ESC)特异的转录因子 POU5f1 转录因子 4(Oct-4)。采用添加 5% 人卵泡液的培养基诱导 14 d 后,对照组大部分细胞仍保持上皮细胞的多角形态,而诱导组细胞融合呈集落样生长。E₂ 含量检测结果显示,对照组无 E₂ 生成,而诱导组 E₂ 水平从第 8 d 开始增加,至第 10 d 达到高峰,然后下降。RT-PCR、Western blot 结果表明,诱导组生殖细胞特异性基因生长分化因子 9(GDF9)、无精症缺失基因(DAZL)的 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$),而联合复合体蛋白 3(SCP3)的 mRNA 表达水平无明显升高($P > 0.05$),DAZL 的蛋白表达水平亦明显增加($P < 0.05$)。**结论** 人卵泡液可在体外诱导 hAECs 向雌性生殖细胞方向转分化。

【关键词】 羊膜上皮细胞 人卵泡液 细胞转分化 生殖细胞

Preliminary Research on the Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells into Female Germ Cells WANG Fei¹, LIU Xiao-jing², WANG Hui¹, WU Wen-chao², ZHENG Ai^{1△}. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Regenerative Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zazheng716@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To establish the method for isolation and culturation of human amniotic epithelial cells (hAECs) *in vitro*, and to investigate the differentiation potential of hAECs towards germ cells. **Methods** hAECs were isolated from human term placenta and identified by immunocytochemistry. hAECs were sequential induced to form germ cells in medium supplemented with 5% human follicular fluid. Morphological changes were observed by inverted microscope. The oestradiol levels in the spent media were assayed. The expression of germ cell special genes and protein were examined by Real-time PCR and Western blot separately. **Results** Most of the isolated hAECs were polygon and of typical alabstone-like appearance, could express cytokeratin 19, the specific marker of epithelial cells, as well as octamer-binding protein 4 (Oct-4), a specific marker of embryonic stem cells (ESCs). After induced in medium supplemented with 5% human follicular fluid for 14 days, these stem cells grew as aggregates morphologically. Aliquots of supernatant of culture were collected and were assayed for oestradiol using chemiluminescence immunoassay (CLIA), although oestradiol was absent in the control group, the levels of the induction group were increased by day 8 and reached the maxima by day 10. Our study showed that hAECs treated with human follicular fluid were able to express germ cell genes, including growth differentiation factor 9 (GDF9) and deleted in azoospermia-like (DAZL) ($P < 0.05$), but without synaptonemal complex protein 3 (SCP3) ($P > 0.05$). The DAZL protein were also examined ($P < 0.05$). **Conclusion** Germ cells could be induced *in vitro* from hAECs by human follicular fluid.

【Key words】 Amniotic epithelial cell Human follicular fluid Cell transdifferentiation Germ cell

由于社会、个人、精神、心理、环境等因素综合影

响,世界范围内不孕不育的发病率呈逐年递增的趋势,临床上辅助生殖技术在治疗不孕不育方面应用广泛,但却不能治疗生殖细胞缺如如卵巢早衰和妇科肿瘤术后的不孕患者^[1]。2003 年,Hübner 等^[2]

^{*} 四川省科技计划项目(No. 2011SZ0137)资助

△ 通讯作者, E-mail: zazheng716@yahoo.com.cn

最早报道胚胎干细胞在体外成功诱导出卵母样细胞,为生殖细胞缺如不孕患者的治疗带来新的希望。但是胚胎干细胞高表达端粒酶活性,具有致瘤性,且其来源存在伦理学争议^[3],使其临床应用受到限制。

研究显示,同样具有多能性的羊膜上皮细胞能够表达多潜能干细胞特定的转录因子 POU5f1 转录因子 4(octamer-binding protein 4, Oct-4) 和 Nanog 基因等,但不表达干细胞中的端粒酶基因,不能无限增殖,具有非致瘤性^[4,5]。此外,人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)来源于产后废弃胎盘,来源充分,无伦理学争议,且其不具有免疫原性,在移植时不会出现免疫排斥反应,比胚胎干细胞在干细胞移植治疗方面更具有优越性。体外研究已证实 hAECs 具有向 3 个胚层细胞分化的能力,是一种具有诸多明显优势的干细胞,而目前国内外尚无 hAECs 体外转分化为生殖细胞的研究报道。为此,本实验采用人卵泡液为诱导剂,从形态学和基因蛋白水平观察其对 hAECs 的作用,观察是否有雌性生殖细胞生成,以期对生殖细胞缺如女性不孕患者的干细胞移植治疗和再生医学提供一种新的种子细胞来源。

1 材料和方法

1.1 组织来源及主要试剂

1.1.1 组织来源 实验所用胎盘组织取自四川大学华西第二医院产科行剖宫产的健康孕妇,血清学和病毒学检测阴性,卵泡液取自医院辅助生殖技术中心体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)助孕的妇女,均为单纯输卵管性不孕,经过患者知情同意,并经医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 DMEM 低糖培养基、胎牛血清、人上皮生长因子购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自 Amreseco, PCR 引物、TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, Real-time PCR (RT-PCR) 试剂盒购自 Toyobo, cocktail 购自 Roche 公司, DAZL(C-20) 山羊多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, 辣根酶标记的兔抗山羊 IgG 购自中杉金桥, 倒置相差显微镜为 Olympus 产品, 雌二醇(estrogen, E₂) 水平经四川大学华西第二医院检验科化学发光免疫技术测定。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 生长分化因子 9 基因(growth differentiation factor 9, GDF9) 上游引物: 5'-TTCTATCTGTTGGGC GAGGT-3', 下游引物: 5'-

AGCCGAACAGTGTTG TAGAGG -3'; 无精症缺失基因(deleted in azoospermia-like, DAZL) 上游引物: 5'-GGACCGAAGCATACAAACG-3', 下游引物: 5'-ATTTAAGCATTGCCCCGACT-3'; 联合复合体蛋白 3 基因(synaptonemal complex protein 3, SCP3) 上游引物 5'-AAATCTGGGAAGCCGTC TGT-3', 下游引物 5'-CCCTTCAATAACATCTTC CTCTG-3'; 内参 β -actin 上游引物: 5'- ACTATCG GCAATGAGCGGTTTC-3', 下游引物: 5'- ATGCCA CAGGATTCCATACCC-3'。引物合成由 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 hAECs 分离培养及鉴定 参照 Mike 等^[6]报道方法,将羊膜与绒毛膜钝性分离,置于含有双抗的 D-hank's 液中反复冲洗,用眼科剪剪成小块,加入 0.05% 胰蛋白酶 37℃ 震荡消化 10 min,吸除消化上清液,再加入 0.05% 胰蛋白酶 37℃ 震荡消化 30 min,用含 10% 血清的 DMEM 培养基终止消化,200 目的筛网过滤,收集细胞悬液,200×g, 4℃ 离心 10 min,以 1×10⁷/L 的密度接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 无菌细胞培养箱中培养,2~3 d 后换液,待细胞长至 80%~90% 融合后传代。取原代细胞显微镜下观察其形态变化;并通过常规免疫细胞化学、RT-PCR 检测证实:原代 hAECs 能表达上皮细胞特异性细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19),以及表达 Oct-4 基因(本实验室前期研究^[7]结果证实)。

1.2.3 hAECs 诱导分化 取细胞融合达 80%~90% 的第 1 代 hAECs,分为对照组和诱导组。参照 Dyce 等^[8]报道方案,诱导组 DMEM 培养基中含 5% 胎牛血清、5% 人卵泡液、5000 U 肝素钠,2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇,对照组 DMEM 培养基不含人卵泡液,其他成分同诱导组,每 2~3 d 更换培养基。收集培养上清液用于 E₂ 含量检测,倒置相差显微镜下观察两组细胞形态变化,诱导 14 d 后分别收集两组细胞总 RNA 和蛋白。

1.2.4 RT-PCR 检测基因表达 TRIzol 试剂收集诱导组和对照组 RNA,采用氯仿-异戊醇方法提取总 RNA,以 Oligo 18 为非特异性引物,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。采用 Eva Green RT-PCR 试剂盒,在定量 PCR 仪(BIO-RAD)上进行 PCR 扩增,反应条件为:DAZL 基因 95℃ 2 min, 95℃ 10 s, 56℃ 10 s, 72℃ 15 s, 共 39 个循环; GDF9、SCP3 和 β -actin 反应条件均为 95℃ 2 min,

95 ℃ 10 s, 58 ℃ 10 s, 72 ℃ 15 s, 共 39 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增产物纯度及 *GDF9*、*SCP3* 和 *DAZL* 基因的表达。基因表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示, 计算目标基因与内参基因 β -actin 比值。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 诱导 14 d 后, 用含 cocktail 的蛋白裂解液 RIPA 裂解诱导组 and 对照组细胞, 超声离心后收集蛋白上清, 采用紫外分光光度计测定蛋白浓度, 以 25 mg/孔上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 通过电泳法将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 37℃ 封闭 2 h。分别加入一抗 DAZL 山羊多克隆抗体 (1 : 200), 二抗辣根酶标记兔抗山羊 IgG (1 : 4000), 内参一抗 β -actin 鼠单克隆抗体 (1 : 4000), 二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L) (1 : 2000), 37℃ 孵育 2 h。采用化学发光法检测抗原, 并用凝胶成像扫描系统扫描, 以 DAZL 与内

参 β -actin 的光密度比值为 DAZL 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

所有实验均重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hAECs 形态学特征及鉴定结果

原代 hAECs 生长较快, 培养 2 ~ 3 d 后, 可达 80% ~ 90% 融合, 细胞轮廓清楚, 排列紧密, 为扁平不规则多角形, 具有上皮细胞特有的铺路石样外观, 见图 1。原代 hAECs 表达 *Oct-4* 基因及 CK19 蛋白 (图略)。

原代 hAECs 传至第 3 代后, 细胞贴壁率和生长速度明显下降, hAECs 缺乏端粒酶, 不能无限增殖, 因此后续实验采用 1 代 hAECs。

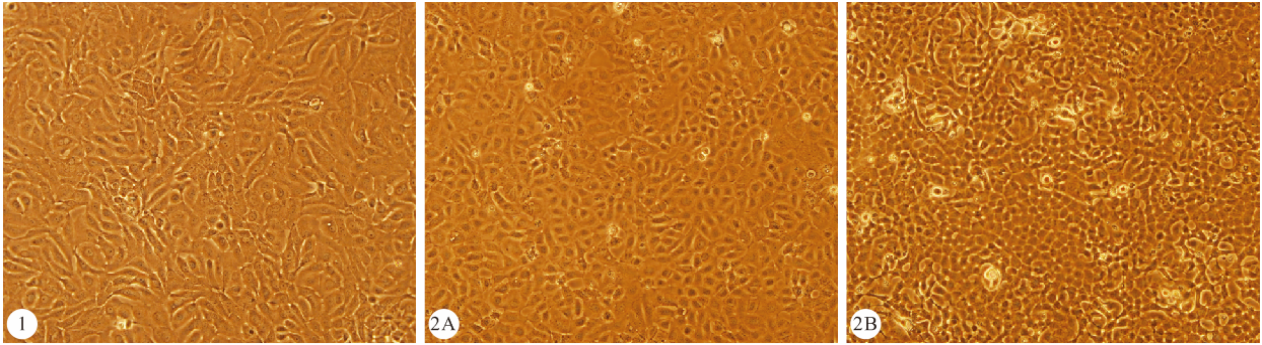


图 1 人羊膜上皮细胞原代。×200 图 2 培养 14 d 后 hAECs 形态学变化。×200
Fig 1 Primary culture of hAECs. ×200 Fig 2 Morphological change of hAECs after 14 d culture. ×200

A: Control group; B: Induction group

2.2 hAECs 形态学改变

倒置相差显微镜观察显示, 诱导 14 d 后, 对照组大部分细胞仍保持上皮细胞特有的扁平不规则多角形 (图 2A); 而经含 5% 人卵泡液培养基诱导后, 部分细胞失去多角形态, 近似球形, 融合呈集落样生长, 边界欠清 (图 2B)。

2.3 培养上清液中 E₂ 水平的变化

化学发光免疫技术检测显示, 诱导 14 d 过程中, 对照组无 E₂ 生成; 诱导组培养基中 E₂ 基础含量约为 $(1.75 \pm 0.09) \times 10^4$ pg/mL, 至第 4 d E₂ 含量降至 $(0.98 \pm 0.07) \times 10^4$ pg/mL, 然后开始增加, 至第 10 d 达到最高峰 $(2.56 \pm 0.06) \times 10^4$ pg/mL, 见图 3。

2.4 RT-PCR 检测生殖细胞特异性基因的表达

3 种基因的 DNA 电泳图见图 4。RT-PCR 结果显示 (图 5), 诱导 14 d 后, 与对照组相比含 5% 卵

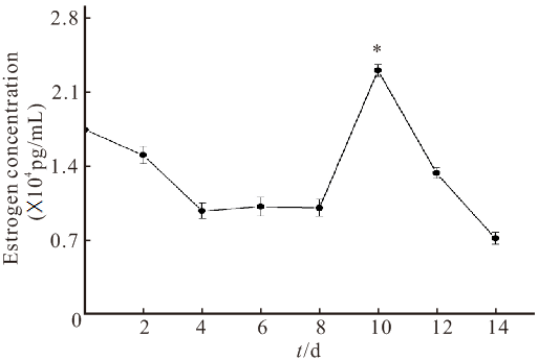


图 3 培养上清液中雌二醇水平的变化 (n=3)
Fig 3 Estrogen concentration in the supernatant of culture at different induction time (n=3)
* $P < 0.05$, vs. other time point

泡液诱导组生殖细胞特异性基因 *GDF9* 和 *DAZL* 的 mRNA 表达量明显升高,两组间差异有统计学意义($P<0.05$),而 *SCP3* 的 mRNA 表达量与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

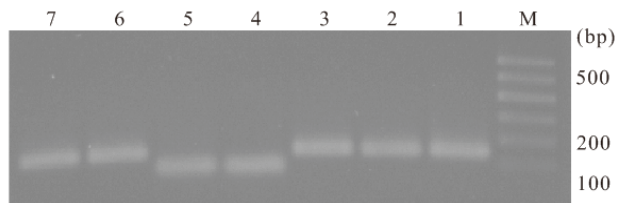


图 4 3 种基因的 DNA 电泳图

Fig 4 DNA electrophoresis for three different genes

M: Marker; 1,2,3: *GDF9* mRNA; 4,5: *SCP3* mRNA; 6,7: *DAZL* mRNA

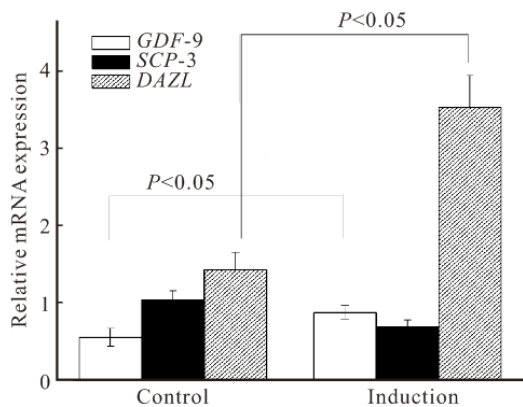


图 5 RT-PCR 检测生殖细胞特异基因的表达变化($n=3, 2^{AACT}$)

Fig 5 Detection of germ cell special gene expression with RT-PCR ($n=3, 2^{AACT}$)

2.5 Western blot 检测 DAZL 蛋白的表达

Western blot 结果显示,诱导 14 d 后,诱导组 *DAZL* 蛋白表达水平为 0.707 ± 0.032 ,对照组为 0.174 ± 0.059 ,两组间差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

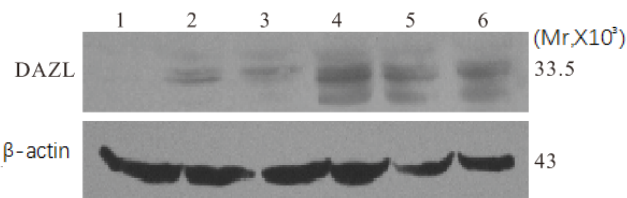


图 6 Western blot 检测 DAZL 蛋白的表达变化

Fig 6 Detection of DAZL protein expression by Western blot assay

1,2,3: Control group; 4,5,6: Induction group

3 讨论

胚胎干细胞向生殖细胞分化的实现,使干细胞移植治疗不孕不育成为可能。自 Hübner 等^[2]首先

报道其在体外成功诱导鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)分化为卵母样细胞之后,国内外大量的研究证实,ESCs 在体外特定环境中能够转分化为生殖细胞^[8,9]。但是,胚胎干细胞来源一直存在伦理学争议,而且其高度表达端粒酶活性,具有致癌性^[3],使 ESCs 在细胞治疗、组织工程、器官修复等方面的临床应用受到限制。

人羊膜上皮细胞起源于受精 8 d 后原肠胚形成之前的外胚层^[10],有可能保持有原肠胚形成前期胚胎干细胞的可塑性。近年研究表明 hAECs 在不同生长因子和一定的微环境调控下,可以分化为 3 个胚层不同类型的细胞,能表达多潜能干细胞特定的转录因子 Oct-4 和 Nanog^[4],说明 hAECs 具有类似 ESCs 的多向分化潜能。同时, hAECs 不表达干细胞的端粒酶基因,不能无限增殖,具有非致癌性。Adinolfi 等^[11]证实 hAECs 不具有免疫原性,可避免移植后免疫排斥反应的发生。此外人羊膜上皮细胞还可分泌抗炎因子,可以防止移植后炎症反应的发生^[12]。另外,羊膜上皮细胞来源于剖宫产术后废弃胎盘组织,取材便捷。因此,将其应用于细胞移植比胚胎干细胞更具有优越性^[13,14],可能是未来细胞移植或组织工程重建的一种新型种子细胞。

近年来,妇科恶性肿瘤有逐步年轻化的趋势,且发病率越来越高,临床治疗以手术为主,辅以放疗和化疗。卵巢为女性性激素分泌器官,大部分患者经术后放疗、化疗后,快速出现卵巢衰竭,体内雌激素水平骤降,发生一系列的更年期综合症,如潮热盗汗、阴道萎缩、性欲下降等,严重影响患者的生存质量。目前激素替代治疗是其主要治疗手段,但是会增加这些妇女发生血栓性疾病、肝肾功能损害等的风险。因此,如何寻找天然或近天然激素来源,进行安全有效的激素替代治疗,改善患者生存质量,是妇科肿瘤专家研究的热点^[15]。本实验检测到诱导组细胞培养上清液中雌二醇激素的表达,提供了一种生理性激素来源,使天然激素替代治疗成为可能。且正常人卵巢组织中,雄激素前体在卵泡膜细胞经芳香化转变为雌激素,诱导培养基中雌激素的表达,表明诱导细胞中可能有卵泡膜细胞或颗粒细胞生成^[9]。

本实验采用人卵泡液为诱导剂,诱导 14 d 后,观察到细胞呈融合生长,这一形态学改变与 Dyce 等^[8]文献报道相一致。研究表明, *DAZL* 基因在生殖细胞发育早期开始表达,是减数分裂前生殖细胞的标志基因, *GDF9* 是卵母细胞分化后期的特异标

志,SCP3 是检测哺乳动物发生减数分裂转变的高度特异性标志^[9]。本实验应用 RT-PCR 技术检测到诱导组细胞,其生殖细胞特异性基因 *GDF9*、*DAZL* 的 mRNA 表达水平高,而 *SCP3* 的 mRNA 表达量与对照组相比无明显差异,并用 Western blot 方法检测到 *DAZL* 蛋白表达水平升高。说明人卵泡液可在体外诱导 hAECs 向雌性生殖细胞方向转分化,但是该细胞并不具备进入减数分裂的能力。

干细胞分化与微环境密切相关。人卵泡液是卵细胞生长发育的微环境,其中含有多种激素及许多对卵细胞生长发育有重要影响的生物活性因子,如干细胞因子(SCF)、成纤维细胞生长因子及雌激素等,在细胞的生长、迁移、增殖和分化中起着非常重要的作用^[8]。卵泡液中各生物活性因子单独或组合,诱导 hAECs 向生殖细胞方向分化,但各生物活性因子在转分化中具体作用及其机制目前还不清楚。

本研究证实,人卵泡可诱导 hAECs 向雌性生殖细胞方向转分化,为体外生殖细胞的诱导分化提供了一种新的干细胞来源,也为不孕不育患者辅助生殖治疗带来新的希望。但是,本实验研究过程中未明确卵细胞生成,生成的原始生殖样细胞不能进入减数分裂阶段,表明与国内外目前大量的研究一致,可能无法得到成熟的具有功能的卵细胞,想要获得有功能成熟的卵细胞,未来仍需要进一步深入的研究。

参 考 文 献

1 王原媛,黄勋彬. 干细胞向生殖细胞分化的研究进展. 国际生殖健康/计划生育杂志,2011;30(6):462-466.

2 Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*,2003;300(5623):1251-1256.

3 Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, *et al.* Generation of human

embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng*,2009;102(2):493-507.

4 Miki T, Lehmann T, Cai H, *et al.* Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*,2005;23(10):1549-1559.

5 Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*,2008;26(2):300-311.

6 Miki T, Marongiu F, Dorko K, *et al.* Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*,2010;DOI: 10.1002/9780470151808.sco03s12;1E.3.1-1E.3.10.

7 韩晓宇,万 琪,吴文超. 激活素 A 和骨形成蛋白-4 诱导人羊膜上皮细胞转分化为心肌样细胞的实验研究. 生物医学工程杂志,2011;28(6):1217-1222.

8 Dyce PW, Shen W, Huynh E, *et al.* Analysis of oocyte-like cells differentiated from porcine fetal skin-derived stem cells. *Stem Cells Dev*,2011;20(5):809-819.

9 Dyce PW, Wen L, Li J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol*,2006;8(4):384-390.

10 Murphy S, Rosli S, Acharya R, *et al.* Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*,2010;[Chapter 1]:Unit 1E 6.

11 Adinolfi M, Akle CA, McColl I, *et al.* Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*,1982;295(5847):325-327.

12 Li H, Niederkorn JY, Neelam S, *et al.* Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2005;46(3):900-907.

13 宋秀军,陈代雄,江其生. 人羊膜上皮细胞的研究进展. 中国组织工程研究与临床康复,2008;12(25):4927-4930.

14 Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, *et al.* Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*,2003;12(1):1-11.

15 阳 艳. 宫颈癌病人的激素替代治疗. 药品评价,2012;9(9):35-41.

(2012-09-13 收稿,2012-12-06 修回)

编辑 沈 进