

· 综 述 ·

人羊膜细胞神经生物学性状研究进展*

喻皇飞 综述, 陈代雄[△] 审校

(遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州遵义 563003)

关键词: 羊膜, 神经生长因子类; 人羊膜细胞; 移植

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)32-3315-03

人羊膜组织是位于胎儿绒毛膜表面的一层光滑、无神经、无血管及淋巴管的半透明薄膜, 厚约 0.02~0.50 mm, 由胚胎发育期细胞滋养层演化而来, 主要含有两种类型细胞, 羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)和羊膜间充质细胞(human mesenchymal cells, hAMCs), 所谓人羊膜细胞是 hAECs 和 hAMCs 的总称。近年来大量研究显示人羊膜细胞具有很强的可塑性和多向分化潜能, 在适当生长因子的调节下可向 3 个胚层细胞分化, 被视为一种成体干细胞。此外, 发育生物学认为神经发育早期, 羊膜组织与神经上皮直接联系, 向羊水中释放神经递质和神经营养因子, 在神经系统发育过程中起重要作用。同时, 研究还表明 hAECs 和 hAMCs 本身也具有神经细胞和神经前体细胞的某些生物学特性。在各种中枢神经系统相关疾病治疗效果都不尽如人意的条件下, 干细胞替代治疗作为神经系统再生医学中的一种新的治疗方案展现出诱人的前景, 而人羊膜细胞极有可能由于其自身独有的优势成为细胞移植治疗中枢神经疾病的新的细胞资源。本文就有关人羊膜细胞神经生物学性状及其相关的临床前应用研究进行综述。

1 羊膜细胞神经生物学性状

1.1 羊膜细胞本身表达神经细胞特异性蛋白 日本学者 Sakuragawa^[1]的研究小组对 hAECs 的神经生物学特性进行了深入的研究。1996 年他们首先利用免疫细胞化学技术检测到 hAECs 波形蛋白的表达, 同时部分 hAECs 还表达神经元特异性标记蛋白神经纤维丝(neruofilament proteins, NF)、微管相关蛋白 2(micotubule-associated proteins, MAP2)、星型胶质细胞标记胶质细胞酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、环核苷酸磷酸二酯酶(2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase)及少突胶质细胞标记髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)和半乳糖脑苷脂(galactocerebroside, GC), 说明 hAECs 具有神经细胞特性^[1]。随后他们利用 RT-PCR 及 RNA 印迹法证实 hAECs 中 MBP 和 MAP2 相应 mRNA 的表达^[2]。Miki 等^[3]也发现, 培养的 hAECs 还表达神经干细胞的特异性标志蛋白——巢蛋白, 但不同的培养环境会造成 hAECs 神经细胞标志表达变异^[4]。国内蔡哲等^[5]也指出 hAECs 同时表达神经干细胞特异性标记蛋白巢蛋白。以上研究均提示 hAECs 具有与神经细胞相似的生物学特性, 很可能具备神经细胞的部分功能。

2004 年 Sakuragawa 等^[6]的研究首次显示了羊膜组织中 hAMCs 也表达巢蛋白, 溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记结果显示, 66%~88%的 hAMCs 为 BrdU 阳性, 说明 hAMCs 具有较强的增殖潜能。同时 hAMCs 中还存在微管蛋白 β (β -tubu-

lin)、中分子量神经丝蛋白(NF-M)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性细胞, 这些结果显示 hAMCs 表达神经细胞特异性蛋白, 与 hAECs 相似, hAMCs 同样具有神经细胞的某些生物学特性。此外, 在培养基中只添加维甲酸条件下, hAMCs 可被诱导分化成 CD133、巢蛋白及 NF-200 阳性 3 个神经细胞亚群, 说明 hAMCs 中存在处于不同等级阶段的神经细胞^[7]。但目前为止, 尚无 hAMCs 在体内分化成具有功能活性的神经细胞的相关报道, 值得进一步的研究证明。

1.2 合成及分泌神经递质 hAECs 具有胆碱乙酰基转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)活性并能合成释放乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)。培养的 hAECs 经免疫染色显示 ChAT 阳性, 利用高效液相色谱法(HPLC)可从 hAECs 的培养基中检测到 Ach 的存在, 并且这种分泌效应与所孵育时间呈依赖关系, 通过 RT-PCR 和蛋白质印迹进一步验证了 hAECs 中 ChAT mRNA 及其所合成的 Ach 的存在^[8]。另外, Elwan 和 Sakuragawa^[9]研究发现培养人类羊膜上皮细胞上清液中存在儿茶酚胺类(Catecholamines, CA)神经递质, 如肾上腺素(adrenephrin, AD)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)及多巴胺(dopamine, DA), 在 hAECs 的培养基中添加左旋酪氨酸和四氢唑啉能够显著的提高 CA 的产量, 而使用酪氨酸羟化酶(TH)抑制剂 MPT 则使 CA 的产量显著的降低, 说明 hAECs 具有合成 CA 的能力。同时证据还显示在 hAECs 的培养基中存在 DA 代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC), 说明 hAECs 同样含有 DA 代谢酶^[9]。随后, Kakishita 等^[10]检测到 hAECs 中代谢多巴胺的关键酶即 TH 的 mRNA 和蛋白的表达, 发现 hAECs 可以直接摄取多巴并将其转化为 DA^[11]。紧接着该研究小组又证实培养的 hAECs 存在 DA 受体(D1、D2)及 DA 转运蛋白(DAT)相应的 mRNA 和结合位点, 且与人脑内受体蛋白 mRNA 具有 100%的同源性^[12-14], 进一步从分子生物学水平揭示了 hAECs 具有执行 DA 能神经元的功能。

1.3 神经营养作用 早在 20 世纪 80 年代末, Davis 等^[15]人就发现羊膜基质对捷状神经元轴突和胆碱能神经元有营养作用。Colombo 等^[16]也报道了人和鼠的羊水均对来源于神经管的大鼠胚胎细胞具有营养功能, 提示羊膜组织可能向羊水中释放营养因子促进胚胎期神经细胞的发育。而 Uchida 等^[17]的研究直接证明了 hAECs 分泌释放神经营养因子的能力。他们首先发现羊膜组织中存在神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及神经营养因子 3(neurotrophin-3, NT-3), 通过 RT-PCR 分析显示 hAECs 表达 NGF 及 NT-3 mRNA, 并在 hAECs 的培养基中检测到一定浓度的 NGF、NT-3, 发现 hAECs 的条

* 基金项目: 贵州省科学技术厅、遵义医学院、遵义市科技局联合基金资助[黔科合 J 字 LKZ(2010)19 号]。 [△] 通讯作者, Tel: (0852)

件培养基对 E18 大鼠神经细胞的生长具有明显的营养作用。随后他们又发现 hAECs 能合成分泌脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和睫状神经生长因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) [18]。此外,在冻存后的羊膜组织中检测到表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF) 等相应的 mRNA 的表达 [19], 而实验证明 EGF、TGF 和 IGF 对 DA 能神经元细胞具有营养活性 [20]。最近的研究还发现, AECs 还能分泌 EGF 和 FGF-2 促进睫状神经的生长 [21], 并诱导神经干细胞 (neural stem cells, NSC) 向神经细胞分化 [22], 这些结果不仅支持羊膜细胞可向羊水中分泌释放多种神经营养因子, 对早期阶段的胚胎神经发育起重要作用的假说, 同时也显示了羊膜细胞治疗神经系统退行性病变的应用潜能。

2 羊膜细胞在神经系统疾病中的临床前应用研究

2.1 帕金森病 (Parkinson disease, PD)

PD 是一种常见的神经系统变性疾病, 以中脑黑质多巴胺能神经元变性坏死和纹状体区多巴胺 (dopamine, DA) 水平减少为主要病理特点。羊膜细胞以其特有的神经生物学特性在 PD 的治疗中可作为理想的供体细胞来源。Yang 等 [23] 发现在体外 hAECs 具有酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 活性并在合成分泌 DA 的基础上将 hAECs 用 LacZ 基因标记后植入 PD 模型大鼠, 发现移植体至少可以存活 2 周, 移植部位存在人源性 TH 阳性细胞, 同时吗啡诱导的大鼠旋转症状得到明显改善。hAECs 移植能控制改善 PD 症状, 有可能是通过分泌神经营养因子阻止黑质 DA 能神经元的死亡, 也可能是植入的 hAECs 在 PD 大鼠脑内通过分泌 DA 补充缺失的神经递质以减轻 PD 症状。谢惠芳等 [24] 将导入 BDNF 基因的 hAECs 植入 PD 大鼠脑内, 14 周后仍然可观察到 TH 阳性细胞的存在并表达 BDNF, 明显改善大鼠的旋转行为, 说明导入 BDNF 的 hAECs 对 PD 的症状改善有明显的促进作用。而蔡哲等 [25] 也报道 hAMCs 移植致使 PD 小鼠自发运动次数的增加, 转杆时间延长, 并能在其体内形成 TH 阳性神经元, 从而缓解 PD 小鼠运动功能障碍。这些研究预示羊膜细胞在 PD 的治疗方面有着诱人的前景。

2.2 脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI)

SCI 后所致脊髓神经元的丧失, 脊髓修复能力和促进修复因素的缺乏, 同时神经元坏死后形成的胶质瘢痕和空洞阻碍了轴突的生长, 使 SCI 后的治疗变得极为棘手。现有的治疗方法包括手术、药物和物理康复等, 虽有一定疗效, 但很难阻止病变发展。羊膜细胞移植可增加脊髓神经细胞数量、减少胶质瘢痕和空洞的形成, 有望成为一种有效的治疗方法。

Sankar 和 Muthusamy [26] 首次将 Dil 标记的 hAECs 移植到猴的脊髓损伤部位, 经过长达 60 d 的观察, 发现宿主脊髓中有被 Dil 标记的神经元和轴突, 在损伤处并没有胶质瘢痕的形成, 说明 hAECs 能在脊髓损伤环境中长期存活并通过营养作用促进受损轴突的发芽再生、抑制瘢痕的形成。Wu 等 [27] 将 hAECs 用荧光染料标记后以明胶海绵为载体行大鼠脊髓完全横断损伤后的原位移植, 发现 8 周后仍可观察到标记的羊膜细胞, 移植组与对照组相比损伤处有大量的红核神经元和髓鞘纤维的存在, 且两组后肢运动功能评分有明显差异, 细胞移植组为 (9.0 ± 0.89) 分, 而 PBS 对照组仅为 (3.7 ± 1.03) 分, 提示 SCI 后 hAECs 移植可保存脊髓残存神经元并改善大鼠后肢运动功能。向 SCI 大鼠体内移植 hAECs, 同时配合电针和甲泼尼龙琥珀酸钠治疗, 发现 hAECs 能有效抑制损伤处胶质瘢痕形成、恢复脊髓轴浆转运功能, 进而促进神经纤维再生 [28]。以

上研究均显示了羊膜细胞移植对脊髓损伤后病理修复和功能改善有着积极的促进作用, 然而其具体作用机制未得到很好的阐明, 仍有待于进一步研究。

2.3 缺血性脑病

羊膜细胞同时可作为脑缺血损伤后坏死的神经细胞替代治疗的供体细胞。研究证明, 羊膜细胞可在胎鼠脑组织内长期存活、迁移并分化 [29]。将羊膜上皮细胞移植入双侧颈总动脉闭塞的成年沙鼠海马中, 5 周后增殖的细胞迁移至 CA1 区锥体细胞层并转变成神经元样细胞, 提示 hAECs 治疗脑缺血损伤的可能 [30]。Liu 等 [31] 发现 hAECs 不仅在缺血脑组织内分化成神经元和神经胶质细胞, 还能有效抑制受损神经细胞凋亡, 减少缺血面积, 同时改善大鼠神经功能。这些结果提示羊膜细胞作为供体细胞移植治疗缺血性脑病良好的应用前景, 还有望成为缺血性脑病基因治疗理想的细胞载体。

3 问题与展望

综上所述, 由于人羊膜细胞具有干细胞特性及其天然的神经理物性状, 加之人羊膜细胞有低免疫原性的特点, 尤其是人羊膜细胞来源于大量被遗弃的胎盘, 是再生医学中没有争议的细胞来源, 可将其视为治疗中枢神经系统障碍理想的供体细胞。然而, 目前关于羊膜来源两种细胞的神经理再生相关研究还不够深入, 其神经替代作用和神经营养作用也还有待于更多的动物模型加以证明, 移植后神经功能的改善也需要更长时间的观察验证。特别是 hAMCs, 其神经再生作用报道较少。但毋庸置疑的是, 羊膜细胞作为供体细胞移植治疗中枢神经系统疾病有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, et al. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 209: 9-12.
- [2] Ishii T, Ohsugi K, Nakamura S, et al. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell type-specific expression system [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 268: 131-134.
- [3] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1549-1559.
- [4] Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, et al. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 14(19): 22-29.
- [5] 蔡哲, 潘琳, 舒峻, 等. 人类羊膜细胞表达神经干细胞特异性蛋白研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2005, 11(12): 965-967.
- [6] Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells [J]. *Neurosci Res*, 2004, 78: 208-214.
- [7] Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194: 664-673.
- [8] Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K, et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells; applicable to intracerebral allografting for neurologic disease [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 232: 53-56.

- [9] Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells [J]. *Neuroreport*, 1997, 8: 3435-3438.
- [10] Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson disease; a potential source of donor for transplantation therapy [J]. *Exp Neurol*, 2000, 165: 27-34.
- [11] Elwan MA. Synthesis of dopamine from L-3, 4-dihydroxyphenylalanine by human amniotic epithelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 354(1): R1-2.
- [12] Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N. Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 344: 157-160.
- [13] Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N. Characterization of dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in human placenta amniotic epithelial cells [J]. *Placenta*, 2003, 24(6): 658-663.
- [14] Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N. Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 342(1/2): 61-64.
- [15] Davis GE, Blaker SN, Engvall E, et al. Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo [J]. *Science*, 1987, 236 (4805): 1106-1109.
- [16] Colombo J, Napp M, Depaoli JR, et al. Trophic influences of human and rat amniotic fluid on neural tube-derived rat fetal cells [J]. *Dev Neurosci*, 1993, 11(3): 347-355.
- [17] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 62(4): 585-590.
- [18] Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 341 (1): 1-4.
- [19] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 20(3): 173-177.
- [20] Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, et al. Neurotrophic factor from molecule to man [J]. *Trends Neurosci*, 1994, 17: 182-190.
- [21] Venkatachalam S, Palaniappan T, Jayapal PK, et al. Novel neurotrophic factor secreted by amniotic epithelial cells [J]. *Biocell*, 2009, 33(2): 81-89.
- [22] Meng XT, Chen D, Dong ZY, et al. Enhanced neural differentiation of neural stem cells and neurite growth by amniotic epithelial cell co-culture [J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(7): 691-698.
- [23] Yang X, Song L, Wu N, et al. An experimental study on intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(10): 1054-1059.
- [24] 谢惠芳, 刘天津, 郭礼和. 人羊膜上皮细胞移植及基因治疗帕金森病大鼠 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29: 429-433.
- [25] 蔡哲, 周忠蜀, 向青, 等. 人羊膜间充质细胞的神经生物学特性及其治疗帕金森模型小鼠的实验研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(4): 318-321.
- [26] Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research [J]. *Neuroscience*, 2003, 118(1): 11-17.
- [27] Wu ZY, He GZ, Li Y, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury [J]. *Chinese Med J*, 2006, 119 (24): 2101-2107.
- [28] 李一帆, 陈东, 薛辉, 等. 甲强龙、电针联合羊膜上皮细胞移植对脊髓损伤大鼠轴浆运输功能及 GFAP 表达的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2010, 36(4): 620-624.
- [29] Marcus AJ, Coyne TM, Black IB, et al. Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation [J]. *Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1256-1264.
- [30] Okawa H, Okuda O, Arai H, et al. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(18): 4003-4007.
- [31] Liu T, Wu J, Huang Q, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. *Shock*, 2008, 29(5): 603-611.

(收稿日期: 2011-01-06 修回日期: 2011-06-07)

· 综 述 ·

δ 阿片受体激动剂在脓毒症时脏器保护作用的研究进展

张志坚, 肖娟综述, 彭礼波 审校

(重庆市巴南区人民医院重症监护治疗病房 330012)

关键词: 受体, 阿片样, δ; 多器官功能衰竭; 脓毒症

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.044

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)32-3317-04

脓毒症(sepsis)是严重创伤、烧伤、休克、大手术后常见的并发症,主要是由病原微生物入侵机体引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),容易

发展成为脓毒性休克(septic shock)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。机体促炎症反应和抗炎反应间的不平衡、凝血-纤溶系统功能紊乱、神