

人羊膜上皮细胞和人羊膜间充质干细胞的研究进展

薛玲玲¹ 陈锦阳¹ 庄盼¹ 刘军权^{1,2}

【摘要】 人羊膜上皮细胞和人羊膜间充质干细胞存在于人羊膜组织中,统称为人羊膜细胞。人羊膜细胞可塑性强,具有多向分化的潜能;并且免疫原性低,移植不会发生免疫排斥反应,成为近年来研究的热点。人羊膜上皮细胞和人羊膜间充质干细胞的生物学特性使其符合干细胞药物产品的标准,将其应用于诸多疾病的治疗,如心肌梗死、脑梗死和肾损伤等,均已取得良好的疗效,此外还为许多疑难杂症提供了治疗方向。本文将从羊膜细胞的生物学特性、分离方法、表面标记物、分化潜能和对相关疾病的研究进展等方面进行综述。

【关键词】 人羊膜上皮细胞; 人羊膜间充质干细胞; 生物学特性; 分化潜能

Updated progress of human amniotic epithelial cells and human amniotic mesenchymal stem cells Xue Lingling¹, Chen Jinyang¹, Zhuang Pan¹, Liu Junquan^{1,2}. ¹Zhejiang Weiwei Biomedical Science and Technology Co., Ltd, Hangzhou 310053, China; ²Hangzhou Golden Domain Medical Laboratory Co., Ltd, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: Liu Junquan, Email: xzljq19600115@sina.com

【Abstract】 Human amniotic epithelial cells and human amniotic mesenchymal stem cells exist in human amniotic tissue, which are called human amniotic cells. Human amniotic cells have strong plasticity and multi-directional differentiation potential. And cells are always with low immunogenicity that immune rejection will not occur often after transplantation. These characteristics make the cells become a research hotspot in recent years. At the same time, these characteristics also enable them to conform to the standards of stem cell drug products, which used in the treatment for many diseases, such as myocardial infarction, cerebral infarction, kidney injury and so on, the results were showed that it achieved good results. In addition, it also provides the treatment direction for many difficulty and complicated diseases. This article will review the biological characteristics, separation methods, surface markers, differentiation potential and the research progress of related diseases of human amniotic cells.

【Key words】 Human amniotic epithelial cells; Human amniotic mesenchymal stem cells; Biological characteristics; Differentiation potential

胚胎在发育过程中形成胎膜,胎膜的最内层为羊膜,羊膜由厚的基底膜和无血管基质组成。电镜下,羊膜从内而外可分为5层:上皮层、基底膜层、致密层、纤维母细胞层和海绵层。人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)来源于上皮层,由胚泡内细胞团发育而来,上皮层与羊水直接接触;基底膜层由狭窄的无细胞网状纤维构成;致密层决定羊膜的张力,由大量的胶原纤维和网状纤维组成,占羊膜厚度的90%左右。人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)来源于纤维母细胞层,纤维母细胞层由疏松纤维母细胞和网状纤维构成;海绵层由波浪状网织纤维构成,具有一定的弹性^[1]。hAECs和hAMSCs的免疫排斥作用小,羊膜取材方便属无创操作,胎儿

娩出后胎盘羊膜和脐带常被“废弃”,因此从羊膜的上皮层和纤维母细胞层分离hAECs和hAMSCs,用作细胞替代治疗和再生医学研究已成为本领域的热点。

一、羊膜细胞的基础研究

(一) 羊膜细胞的生物学特性

原代hAECs呈多个小片状生长,P1~P3代的细胞呈铺路石状生长,排列紧密,传至P4代以后细胞逐渐衰老,最多可传至P5代。hAECs不表达端粒酶基因,因此不能无限增殖,不具有致瘤性。Yang等^[2]对非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷小鼠进行皮下注射适量hAECs,结果小鼠未形成肿瘤。此外,他们还将hAECs与海拉细胞(Hela cells)、人Burkitt's淋巴瘤细胞联合注射入实验小鼠体内,结果表明,hAECs对肿瘤的形成几乎没有影响。

原代hAMSCs呈短梭型或多角形贴壁生长,P3代的细胞大部分呈长梭形,细胞可传至P30代左右。hAMSCs同hAECs一样不具有致瘤性^[3]。hAMSCs免疫原性低,免疫

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2021.03.008

作者单位: 310053 杭州,浙江卫未生物医药科技有限公司¹; 310053 杭州,杭州金域医学检验所有限公司²

通信作者: 刘军权, Email: xzljq19600115@sina.com

排斥作用小,具有降低移植物抗宿主反应的作用。帅华洲等^[4]建立异种移植的急性移植物抗宿主病小鼠模型,并注射hAMSCs加以治疗。结果表明,输注hAMSCs能减轻小鼠的移植物抗宿主病表现及靶器官的病理损伤。

(二) 羊膜细胞的分离方法

胰蛋白酶/EDTA技术是目前获得hAECs最有效的方法。在无菌条件下剥离羊膜组织,洗净表面后均分成小块,采用胰酶分步消化方法分离hAECs。每次胰酶消化完后,搅拌并过滤筛去未消化组织,收集滤液,用胎牛血清终止消化。消化结束后合并滤液,离心收集细胞并接种培养^[5]。胰酶分步消化法能够在保证细胞不被酶损伤的前提下,较大程度获得未分化的hAECs。

hAMSCs的分化和增殖能力强,常见的培养方法有酶消化法、percoll液分离法和组织块贴壁法等。酶消化法是使用胰蛋白酶消化去除hAECs,再往剩余组织中加入胶原酶进一步消化,从而获得hAMSCs^[6]。Marongiu等^[7]使用percoll液分离法,即利用密度梯度离心来获得纯度较高的hAMSCs。组织块贴壁法是将剪碎的羊膜组织块直接放入培养瓶中培养,利用hAMSCs的贴壁速度先于hAECs来获得hAMSCs。最新研究表明,在hAMSCs的体外培养过程中,加入适宜浓度的雌二醇可以维持hAMSCs的体外分裂增殖能力^[8]。

(三) 羊膜细胞的表面标志物

hAECs目前尚无特异性表面标记,新分离的hAECs表达上皮细胞特异性表面标志物CK19、人类多能干细胞标志物CD324^[9]以及除端粒酶基因外的胚胎干细胞的其他表面标志物,如SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81、OCT-4、SOX-2和NANOG等^[10]。此外,hAECs还表达间充质干细胞的表型如CD90、CD73,且不表达造血细胞表面标记CD45、CD34、CD14和人类白细胞抗原-DR(human leukocyte antigen, HLA-DR)、HLA-A、HLA-B和HLA-C^[11]。

hAMSCs阳性表达间充质干细胞的表面标志物如CD90、CD105、CD73和CD271等^[12];表达胚胎干细胞的表面标志物OCT-3/4、SSEA-3、SSEA-4、SOX-2、NANOG、REX-1和BMP-4,这说明hAMSCs的分化能力可能是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间;与hAECs一样不表达CD45、CD34、CD14和HLA-DR^[13];但不同的是,hAMSCs不表达上皮特异性表面标志物CK19、CD324等,由此可以与hAECs相区别。

(四) 羊膜细胞的分化潜能

hAECs的分化能力介于胚胎干细胞与成体干细胞之间,具有较全面的分化潜能。Yang等^[14]用剥落的结膜基质和结膜匀浆液诱导培养hAECs,发现培养后的hAECs表达结膜上皮细胞表型。hAECs和神经细胞共同起源于桑椹胚的外胚层细胞。最近的一项研究表明迷迭香酸可以诱导hAECs发生神经元分化^[15]。Maymó等^[10]研究报告,通过地塞米松、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子等联合作用,可诱导hAECs成功向肝细胞样细胞分化。此外还发现hAECs在动物体内可响应促血管生成信号,形成毛细血管样结构,并在

体内分化为肝窦内皮细胞^[16]。此外,hAECs还可以诱导其分化为成骨细胞、心肌样细胞等。

与hAECs相似,hAMSCs同样具有明显的可塑性和多向分化潜能,能够向3个胚层不同组织来源的细胞分化。金瑛等^[17]采用转化生长因子- β 1、bFGF及透明质酸联合或单独诱导hAMSCs向韧带细胞分化。Zhu等^[18]用高度特异性的肌腱细胞标记物Scx作为阳性调控因子,促进hAMSCs定向分化为肌腱细胞,并且提高了包括胶原I和III、纤连蛋白、基质金属蛋白酶-2等肌腱相关分子的表达。此外,hAMSCs还可以分化为成骨细胞和肌细胞等^[19-20]。

二、羊膜细胞对相关疾病的研究进展

近年来,随着人们对干细胞的特性与功能不断深入的研究,干细胞已经成为治疗许多疑难杂症的研究热点与新方向。如前所述,羊膜来源的细胞取材无创、来源广泛,免疫原性低、不具有致癌性且可塑性强,可以向不同组织来源的细胞分化,因此可作为良好的“药物”应用于临床疾病的治疗。目前已有许多关于羊膜细胞治疗各种疾病的报道,如肺损伤、阿尔兹海默症、肾损伤、心肌梗死、脑梗死、关节炎、肝损伤、创面愈合和睾丸修复等。治疗的原理大多与羊膜细胞分泌一些活性细胞因子、发挥免疫调节作用和向病理组织细胞分化有关。

(一) 肺损伤

肺的生理结构特殊,容易因其他组织的炎症创伤而受累及。hAECs可以用于减轻博来霉素^[21]、脂多糖^[22]和高氧等因素引起的肺损伤已得到证实。其机制是通过减少肺内炎症因子的释放、表达II型肺泡细胞表型等作用减轻肺部炎症及纤维化。Tan等^[23]研究发现,hAECs来源的外泌体可以减轻博来霉素诱导的肺损伤并且能够促进内源性肺修复。其机制可能是通过增强巨噬细胞的吞噬作用,减少中性粒细胞过氧化酶,直接抑制T细胞增殖等,从而减轻肺部炎症及纤维化。Malhotra等^[24]报道了6例患有支气管肺发育不良的早产儿经hAECs治疗后对近期安全性和新生儿预后进行评估,发现hAECs移植对早产儿安全、有效。移植hAECs除了可以下调一些炎症因子,也可能通过调节巨噬细胞的功能来修复肺损伤。移植hAECs可减少肺内巨噬细胞的浸润,并促进肺泡巨噬细胞从促炎性M1表型向促修复性M2表型分化^[25]。此外,hAMSCs可用于减轻体外循环缺血再灌注所致的肺损伤,其作用机制可能与抑制促炎因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素8表达,降低基质金属蛋白酶9表达,加强抗炎因子白细胞介素10表达等有关^[26]。

(二) 阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease, AD)

AD的主要症状为记忆力减退和认知障碍等,目前治疗该疾病的方法较多,但疗效均不理想。高明龙等^[27]建立了AD大鼠模型,将hAMSCs以及脑源性神经营养因子修饰的hAMSCs注射入AD大鼠模型内,发现hAMSCs移植可提高AD大鼠的斜角带和内侧隔核和p75 NGFR阳性神经元数,能增强AD大鼠的学习记忆能力。脑源性神经营养因子可以诱导皮质神经干细胞定向转化为胆碱能神经元,其修饰的干

细胞移植可提高治疗神经损伤性疾病疗效;同时 hAMSCs 分泌的细胞因子可以在一定程度上通过和 p75 NGFR 结合对退变神经元发挥保护作用,减少神经元的丢失,从而提高 AD 大鼠的学习记忆能力。Jiao 等^[28]将 hAMSCs 静脉注射入转基因 AD 模型小鼠体内,发现 hAMSCs 治疗可以通过调节氧化应激来改善 AD 小鼠病理状态以及学习记忆功能。Zheng 等^[29]以淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 和早老素 1 (presenilin 1, PS1) 双转基因小鼠来评估 hAMSCs 移植对 AD 相关神经病变和认知功能障碍的影响。研究发现移植 hAMSCs 能够提高 APP/PS1 小鼠的小胶质细胞水平、增强淀粉样 β 肽 (amyloid-β peptide, Aβ) 清除率、降低神经毒性细胞因子水平、上调皮质和海马区的神经保护性细胞因子,从而减轻认知功能下降,并修复空间学习记忆缺陷。因此, hAMSCs 移植可能是治疗 AD 的一种新的方法。此外, hAECs 移植同样被研究用于治疗 AD。Kim 等^[30]将 hAECs 移植入 AD 模型小鼠体内,通过水迷宫和 Y 迷宫评估其认知功能。结果发现与对照组相比,移植 hAECs 可以显著减轻 AD 小鼠的认知障碍和减少脑内淀粉样斑块的形成并降低 β-分泌酶活性,这表明 hAECs 移植是治疗 AD 的有效方法。

(三) 肾损伤

肾损伤会导致尿滞留、肾小球滤过率下降和电解质紊乱等,严重时会出现尿毒症。导致肾损伤的原因有很多,如暴力损伤、病理损伤及药物损伤等。临床上许多药物如化疗药物、烷化剂和抗代谢药等通过损伤 DNA 或干扰核酸合成、阻滞有丝分裂等作用导致肾损害。牟欢等^[31]研究了 hAMSCs 对严重烧伤大鼠早期肾损伤的治疗作用。结果表明,经 hAMSCs 治疗后的烧伤大鼠,其血清肌酐、尿素氮水平显著降低;促炎因子 TNF-α、IL-1β 的表达也明显降低,而抗炎因子 IL-10 的 mRNA 表达显著高于单纯烧伤组;此外, hAMSCs 可显著减轻肾脏组织凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 -3 的表达。综上, hAMSCs 对严重烧伤大鼠肾脏损伤具有保护作用。hAECs 在治疗肾损伤方面也有研究。Ren 等^[32]证实了在急性肾损伤动物模型中,静脉注射 hAECs 可减轻肾小管毛细血管的丢失、减轻肾小管细胞的凋亡坏死、促进细胞增殖。hAECs 促进巨噬细胞 M1 型极化为 M2 型,导致抗炎因子 IL4、IL13 水平升高,促炎因子 TNF-α 和 IFN-γ 水平降低,这有助于减轻炎症反应。因此, hAECs 的抗炎、抗凋亡和促血管生成作用使肾损伤小鼠肾功能快速恢复,提高生存率。

(四) 心肌梗死 (myocardial infarction, MI)

MI 是冠状动脉闭塞或痉挛所致的血流供应出现急剧减少或中断时间较长,使得部分心肌因严重缺血、缺氧发生局部坏死。近年来,细胞替代治疗 MI 成为研究热点。Fang 等^[33]将 hAMSCs 移植入 MI 模型大鼠体内,1 个月后,移植的 hAMSCs 表达心肌细胞特异性 MHC 标记,表明 hAMSCs 已经分化为心肌样细胞。并且 MI 大鼠在移植 hAMSCs 后,其心肌梗死面积有效减少,其心脏功能也有部分恢复。张臣臣等^[34]认为, hAECs 能够向来源于中胚层的心肌细胞分化,使

用 hAECs 对 MI 进行治疗可以有效减少梗死面积,并且能够通过旁分泌机制来提高心肌细胞生理功能。Maryam 等^[35]研究揭示 hAMSCs 还可通过炎症 MAPK/NF-κB 通路机制,使 NF-κB 和磷酸化 p38 MAPK 表达水平显著降低,从而改善心功能,抑制心肌损伤部位炎症反应,达到治疗心肌梗死的目的。

(五) 脑梗死

脑梗死是神经系统中常见疾病,病死率和致残率高且易复发。目前传统治疗方法仅能改善脑梗死部分临床症状,对脑梗死缺血、坏死组织修复治疗仍缺乏有效手段。hAMSCs 具有干细胞特性,具有向神经细胞分化的能力,其在特定条件下诱导后,能表达神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白、微管蛋白、微管相关蛋白 -2 及神经元特异性核蛋白。

王钰莹等^[36]采用线栓法制作大鼠中动脉闭塞大鼠模型,造模后 1 d,于受损纹状体和皮质两点原位植入 hAMSCs。结果表明,实验组大鼠体重缓慢下降;与模型组相比神经功能损伤评分明显降低,实验组脑梗死面积小于模型组,并且实验组梗死灶缩小,炎症细胞减少,神经细胞坏死数量减少。hAMSCs 移植后 2 周,在梗死灶周围可检测到抗人细胞核特异性抗体 (MAB1281) 阳性细胞,同时表达 NeuN,说明原位移植的 hAMSCs 在脑梗死区域能存活较长时间并且在受损脑内已分化为神经样细胞。以上结果提示 hAMSCs 具有治疗脑梗死的巨大潜能。童宁等^[37]研究在异氟烷干预下,移植 hAMSCs 用于治疗脑梗死的作用。结果表明 hAMSCs 移植联合异氟烷干预对大鼠脑梗死有明显的改善,可促进神经系统修复,提高大鼠的学习和记忆能力,促进脑损伤部位的细胞和组织结构恢复。值得关注的是,该研究是通过尾静脉注射 hAMSCs 进行移植的。尽管在脑梗死后血脑屏障有一定程度的开放,允许移植细胞通过,而异氟烷的干预可以促进更多的 hAMSCs 通过血脑屏障到达梗死部位,进而发挥作用。Yasunori 等^[38]在最新研究中表示,静脉给药也可治疗脑亚急性期心肌梗死小鼠,他们通过实验发现 hAMSCs 可以改善心肌梗死引起的神经功能缺损;降低梗死区周围促炎细胞因子的 mRNA 和蛋白表达水平;抑制 INOS 阳性促炎免疫细胞的增殖及活性;保护血脑屏障免受缺血性梗死引起的潜在损伤;延长梗死区周围神经元细胞的生命周期。这些均提示了 hAMSCs 对于治疗脑梗死有非常显著的作用。

(六) 关节炎

Shu 等^[39]腹腔注射 hAMSCs 进入胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠体内,并且对 CIA 大鼠的关节炎进行宏观和微观评价。结果表明,注射 hAMSCs 可明显改善 CIA 大鼠关节炎的严重程度,降低组织病理学改变;可以显著抑制促炎因子 IFN-γ 和 TNF-α 等的产生;显著提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、总抗氧化能力和降低丙二醛的水平,从而发挥抗氧化作用。因此, hAMSCs 对 CIA 大鼠关节中的炎症因子有明显的抑制作用,可能成为治疗关节炎的一种新的来源。

(七) 肝损伤

许多严重性肝病的治疗需要肝移植或肝细胞移植。由于移植的器官和肝细胞的供体稀缺,使这方面治疗很难满足临床需求。hAMSCs 因其免疫原性弱,致瘤性低等优点,使其在肝损伤的治疗中备受关注。Wang 等^[40]将 hAMSCs 诱导为干细胞源性肝细胞样细胞(stem cells derived hepatocyte-like cells, HLCs),并且将 HLCs 与 hAMSCs、人脐静脉内皮细胞共培养于 3D 胶原支架中,结果共培养的 HLCs 在类器官中的功能得到了改善。此外,将非均质细胞移植入肝纤维化的宿主动物中,表现出更好的移植物存活率,且肝纤维化的程度明显减轻。这表明 hAMSCs 来源的 HLCs 能够改善肝纤维化程度,并且联合移植可提高细胞治疗的效率。此外, hAECs 可通过旁分泌作用,抑制单核细胞/巨噬细胞的聚集,促进巨噬细胞向修复表型分化,诱导调节性 T 细胞分化等,进而修复肝损伤和减轻肝纤维化^[41]。甚至 hAECs 可能支持内源性肝再生,这个理论尚需更多的证据。

(八) 创面愈合

Gao 等^[42]研究了 hAMSCs 对于小鼠创面愈合能力的影响。发现创面多点注射 hAMSCs 可有效提高小鼠创面愈合能力,且高剂量组(1×10^6 /mL)效果优于低剂量组(1×10^4 /mL)。研究者还进一步研究了羊膜间充质干细胞外泌体(hAMSCs-EXOSOMES, hAMSCs-EXO)对伤口愈合的效果,表明 hAMSCs-EXO 也可促进小鼠创面愈合,其主要机理为 hAMSCs-EXO 中的 miR-135a 通过下调细胞迁移相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin 和 LATS2 的表达,从而增强成纤维细胞的增殖及迁移能力,促进伤口愈合。

(九) 睾丸修复

Qian 等^[43]使用白消安持续给药 4 周,使小鼠产生睾丸毒性并丧失产生精子能力,而后通过局部注射 hAMSCs 给予治疗。结果表明 hAMSCs 治疗组小鼠睾丸恢复了精子产生能力,大部分精原细胞、精母细胞、圆形精子细胞和健康精子在精小管中重现,精小管的空泡数量减少;睾酮水平升高;睾丸大小和重量恢复到正常水平。并且 hAMSCs 证实可显著提高被白消安损伤的细胞的增殖能力,抑制其凋亡能力,大幅降低小鼠氧化应激水平。另外,研究还发现经过 hAMSCs 治疗的小鼠其 GCS 基因 Dazl、Ddx4、Miwi 和减数分裂基因 Scp3、Cyclin A1、Stra8 的 mRNA 及蛋白表达量均明显上调,这些基因都与促进精子产生能力相关。其机制为 hAMSCs 通过上调增殖标志物 Ki67 和抗凋亡标志物 BCL2 和 SURVIVIN,下调凋亡标志物 TUNEL、Annexin V、CASPASE3 和 CASPASE9 来抵抗凋亡。综上所述, hAMSCs 对睾丸修复及产生内源性精子能力具有治疗作用。

hAECs 与 hAMSCs 作为同一来源的细胞,彼此之间相互联系但又有所区别。从生物学特性的角度来看,二者虽然细胞形态不同,但都具有不对称分裂的特点,并且都不具有致瘤性。培养两种细胞有很大的区别: hAECs 贴壁时间长于 hAMSCs,并且难以消化,迁移和增殖能力远弱于 hAMSCs, hAECs 不能无限增殖,最多可以传至 P5 代,而 hAMSCs 传

至 P30 代也未见其衰老。hAECs 和 hAMSCs 都表达胚胎干细胞的特异性标志物 SSEA-3 和 SSEA-4,这是二者与其他来源细胞最大的区别。此外二者皆表达一些间充质干细胞表面标志物如 CD73 和 CD90 等,不表达与免疫排斥密切相关的 HLA-DR、HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。但 hAECs 是具有干细胞特性的上皮细胞,其表达上皮细胞特异性表面标志 CK19,不表达间充质干细胞的特异性表面标记物波形蛋白 Vimentin 和 CD105,这是 hAECs 与 hAMSCs 的不同之处。从可塑性的角度来看,二者都具有干细胞特性,都可以进行三系分化,但 hAECs 更倾向于上皮细胞的分化,如角膜上皮细胞、结膜上皮细胞等,而 hAMSCs 具有更大的向中胚层细胞分化的能力^[44]。从疾病治疗方面来说,他们都能够改善一些当下十分棘手的疾病,作为干细胞治疗的“药物”,这两类细胞都有强大的潜能。

随着生物技术水平的提升,人们对 hAECs 和 hAMSCs 的研究也逐渐深入,羊膜干细胞的生物学特性、分离方法以及疾病研究方面也有了更多的报道。羊膜来源的干细胞比一般干细胞具有更多的优点,可以替代许多细胞进行治疗,今后或可为临床上许多疾病的治疗提供方向。

参 考 文 献

- 1 Seyyed-Hadi G, Mohsen A, Tahereh T, et al. The bottlenecks in translating placenta-derived amniotic epithelial and mesenchymal stromal cells into the clinic: current discrepancies in marker reports[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00180.
- 2 Yang P J, Yuan W X, Liu J, et al. Biological characterization of human amniotic epithelial cells in a serum-free system and their safety evaluation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8):1305-1316.
- 3 李岩, 丛姗, 宋瑾, 等. 人羊膜间充质干细胞归巢至小鼠急性损伤肝组织及其致瘤性[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(9):1544-1549.
- 4 帅华洲, 程辉, 陈锐憬, 等. 人羊膜间充质干细胞对异种移植急性性移植抗宿主病的作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(1): 267-274.
- 5 Motedayyen H, Esmail N, Tajik N, et al. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity[J]. *Bmc Research Notes*, 2017, 10(1): 552.
- 6 代敏, 王帅, 张霓霓, 等. 低氧预处理人羊膜间充质干细胞的生物学特征[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(19):3004-3008.
- 7 Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, et al. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells[J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2010, Chapter 1:Unit 1E.5. doi: 10.1002/9780470151808.sc01e05s12.
- 8 毛艳华, 阳媛, 张应凤, 等. 雌二醇对人羊膜间充质干细胞增殖、凋亡的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 044(3): 282-288.
- 9 Centurione L, Passaretta F, Centurione M A, et al. Mapping of the human placenta: experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity[J]. *Cell Transplantation*, 2018, 27(1):12-22.
- 10 Maymó JL, Riedel R, Pérez-Pérez A, et al. Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation[J]. *Plos One*, 2018, 13(1):e0191489.
- 11 Topoluk N, Hawkins R, Tokish J, et al. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells[J]. *Am J Sport Med*, 2017, 45(11):2637-2646.
- 12 Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, et al. Concise review:

- multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, 6(12):2173-2185.
- 13 Phermthai T, Thongbopit S, Pokathikorn P, et al. Carcinogenicity, efficiency and biosafety analysis in xeno-free human amniotic stem cells for regenerative medical therapies[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(8):990-1001.
- 14 Yang SP, Yang XZ, Cao GP. Conjunctiva reconstruction by induced differentiation of human amniotic epithelial cells[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4):13823-13834.
- 15 Ferdousi F, Sasaki K, Uchida Y, et al. Exploring the potential role of rosmarinic acid in neuronal differentiation of human amnion epithelial cells by microarray gene expression profiling[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 779.
- 16 Serra M, Marongiu M, Contini A, et al. Evidence of amniotic epithelial cell differentiation toward hepatic sinusoidal endothelial cells[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(1): 23-30.
- 17 金瑛, 李豫皖, 张承昊, 等. 体外诱导人羊膜间充质干细胞向韧带细胞分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(2): 237-244.
- 18 Zhu X, Liu Z, Wu S, et al. Enhanced tenogenic differentiation and tendon-like tissue formation by Scleraxis overexpression in human amniotic mesenchymal stem cells[J]. *J Mol Histol*. 2020, 51(3):209-220.
- 19 Wang W, Wang ZB, Fu YT, et al. Improved osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells on gradient nanostructured Ti surface[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(9):1824-1833.
- 20 Zhang D, Yan K, Zhou J, et al. Myogenic differentiation of human amniotic mesenchymal cells and its tissue repair capacity on volumetric muscle loss[J]. *J Tissue Eng*, 2019, doi: 10.1177/2041731419887100.
- 21 Jean LT, Sin NL, Bryan L, et al. Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2):180-196.
- 22 夏彦民. hAECs对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及其与NF- κ Bp65的相关性研究[D]. 第四军医大学, 2017, doi: 10.3969/j.issn.1002-7386.
- 23 Tan JL, Lau SN, Leaw B, et al. Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 180-196.
- 24 Malhotra A, Lim R, Mockler JC, et al. Two-year outcomes of infants enrolled in the first-in-human study of amnion cells for bronchopulmonary dysplasia[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(3): 289-294.
- 25 Tan JL, Chan ST, Wallace EM, et al. Human amnion epithelial cells mediate lung repair by directly modulating macrophage recruitment and polarization[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(3): 319-328.
- 26 Qiang Y, Liang GY, Yu LM, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells alleviate lung injury induced by ischemia and reperfusion after cardiopulmonary bypass in dogs[J]. *Lab Invest*, 2016, 95(5): 537-46.
- 27 高明龙, 史少霞, 张坤, 等. 脑源性神经营养因子修饰人羊膜间充质干细胞移植改善老年痴呆大鼠的学习记忆能力[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(9): 1419-1424.
- 28 Jiao H, Shi K, Zhang W, et al. Therapeutic potential of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells in APP transgenic mice[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1877-1883.
- 29 Zheng XY, Wan QQ, Zheng CY, et al. Amniotic mesenchymal stem cells decrease A β deposition and improve memory in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(8): 2191-2207.
- 30 Kim KY, Suh YH, Chang KA. Therapeutic effects of human amniotic epithelial stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2658.
- 31 牟欢, 马平, 周新立, 等. 羊膜间充质干细胞对严重烧伤大鼠肾脏损伤的保护作用[J]. *空军医学杂志*, 2017, 33(5): 308-311.
- 32 Ren YF, Chen Y, Zheng XZ, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate kidney damage in ischemia-reperfusion mouse model of acute kidney injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 410.
- 33 Fang CH, Jin J, Joe JH, et al. *In vivo* differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(8): 1687-1696.
- 34 张臣臣, 尹熙惠, 杨智昉, 等. 人羊膜上皮细胞治疗心肌梗死的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(15): 2504-2508.
- 35 Maryam N, Nahid A. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells exert cardioprotective effects against isoproterenol (ISO)-induced myocardial injury through suppression of inflammation and modulation of inflammatory MAPK/NF- κ B pathway[J]. *Cell and Tissue Banking*, 2021, doi: 10.1007/S10561-021-09915-X.
- 36 王钰莹, 粟旭, 刘波, 等. 人羊膜间充质干细胞原位移植治疗大鼠脑梗死[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(9): 1414-1419.
- 37 童宁, 周业波. 异氟烷干预下人羊膜间充质干细胞移植对大鼠脑梗死的影响[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12(3): 189-193.
- 38 Yasunori Y, Toshinori T, Yoji K, et al. Intravenous administration of human amniotic mesenchymal stem cells in the subacute phase of cerebral infarction in a mouse model ameliorates neurological disturbance by suppressing blood brain barrier disruption and apoptosis via immunomodulation[J]. *Cell Transplantation*, 2021, 30: 1-14.
- 39 Shu J, Pan L, Huang XJ, et al. Transplantation of human amnion mesenchymal cells attenuates the disease development in rats with collagen-induced arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(4):484-490.
- 40 Wang H, Tian Y, Li X, et al. Amniotic mesenchymal stem cells derived hepatocyte-like cells attenuated liver fibrosis more efficiently by mixed-cell transplantation[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2020, 12(1): 11-24.
- 41 Andrewartha N, Yeoh G. Human amnion epithelial cell therapy for chronic liver disease[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/8106482.
- 42 Gao SY, Chen T, Hao Y, et al. Exosomal miR-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting LATS2 expression[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):56.
- 43 Qian CF, Meng QX, Lu JF, et al. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):290.
- 44 Wang JP, Ouyang GF. Phenotypic identification and differentiation potential analysis of two kinds of human amniotic cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Hematology*, 2012, 20(1): 146-153.

(收稿日期:2020-08-18)

(本文编辑:陈媛媛)