

水凝胶三维培养对人羊膜间充质干细胞特性及旁分泌效应的影响

王 旗, 杨晓双, 王达利(遵义医科大学附属医院整形外科, 贵州省遵义市 563000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2299

ORCID: 0000-0002-9744-2176(王旗)

文章快速阅读:

文章特点—

(1)人羊膜间充质干细胞是具有多向分化潜能的典型间充质干细胞,在组织工程及干细胞治疗中应用广泛。但是传统的二维平面细胞培养环境并不是细胞的自然生长状态,因而细胞的基因表达、信号传导和形态学可能存在差异;

(2)实验以水凝胶三维培养环境的人羊膜间充质干细胞为研究对象,观察人羊膜间充质干细胞在三维培养环境中的形态学及分泌创面愈合相关因子的能力。

人羊膜间充质干细胞

普通二维培养
水凝胶三维培养

(1)观察两种培养环境中人羊膜间充质干细胞的形态、波形蛋白表达情况及诱导分化能力;

(2)RT-qPCR 检测两种培养环境中人羊膜间充质干细胞创面修复相关因子的 mRNA 表达情况;

(3)ELISA 检测两种培养环境中人羊膜间充质干细胞创面愈合相关因子的蛋白表达情况。

结论:

(1)在水凝胶作为载体的三维培养支架中培养人羊膜间充质干细胞,可以增强细胞创面修复相关因子基因的表达及其旁分泌效应;

(2)水凝胶是一种良好的人羊膜间充质干细胞创面临床转化研究的载体。

结果:

(1)普通二维培养环境中的人羊膜间充质干细胞呈长梭形,而在水凝胶三维培养环境中呈立体圆形;

(2)水凝胶三维培养环境中的人羊膜间充质干细胞仍然具有成脂、成骨、成软骨分化潜能;

(3)水凝胶三维培养后人羊膜间充质干细胞分泌的某些创面愈合相关因子相对表达量增加;

(4)水凝胶三维培养后人羊膜间充质干细胞分泌的某些创面愈合相关因子的蛋白表达量增加。

王旗,女,1993年生,山东省济宁市人,汉族,遵义医科大学在读硕士,主要从事干细胞与创面愈合相关研究。

共同第一作者:杨晓双,女,1992年生,新疆维吾尔自治区石河子市人,汉族,医师,主要从事创面修复与整形研究。

通讯作者:王达利,教授,硕士生导师,遵义医科大学附属医院整形外科,贵州省遵义市 563000

文献标识码:A

投稿日期:2019-11-11

送审日期:2019-12-02

采用日期:2020-01-08

在线日期:2020-03-31



文题释义:

水凝胶三维培养:应用安全稳定的天然或合成聚合物材料为细胞提供一个空间、立体的生存环境,可增强细胞的黏附、增殖及分泌细胞因子能力。

旁分泌效应:以往研究认为干细胞应用于创面治疗的潜能是干细胞归巢分化为损伤组织,后来发现移植的干细胞大多停留在肝、脾,很少能到达损伤创面。目前研究证实间充质干细胞通过分泌某些营养因子作用于临近的靶细胞,起到促进创面愈合的作用。

摘要

背景:研究表明间充质干细胞在创面愈合中具有减轻炎症反应、促进创面愈合、减轻瘢痕形成的作用,然而以往的普通二维培养环境由于存在细胞间接接触性抑制,可能导致细胞的基因表达、信号传导和形态学存在差异。

目的:观察人羊膜间充质干细胞旁分泌创面愈合相关因子的能力是否受二维培养环境与三维培养环境的影响。

方法:利用传统酶消化法获得人羊膜间充质干细胞后,分别接种于普通细胞培养瓶(二维培养)与 ShakeGel™ 3D 水凝胶中(三维培养),将水凝胶中的人羊膜间充质干细胞分别进行成脂、成骨、成软骨诱导分化,免疫荧光染色确定细胞分化方向;待两种培养环境中的人羊膜间充质干细胞融合至 70%~80%,于倒置相差显微镜和激光共聚焦显微镜下观察细胞的生长特点及形态;培养 24 h 后,应用 RT-qPCR 技术测定细胞旁分泌创面愈合相关因子的 mRNA 相对表达量;培养 48 h 后,利用 ELISA 试剂盒检测细胞旁分泌创面愈合相关因子的蛋白表达量。

结果与结论:①二维培养组人羊膜间充质干细胞呈扁平状,为典型间充质样细胞形态;三维培养组人羊膜间充质干细胞呈圆形,均匀分散于水凝胶的每一层;②三维培养中的人羊膜间充质干细胞具有 3 系诱导分化潜能;③三维培养组白细胞介素 6、白细胞介素 8、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、透明质酸、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子 mRNA 相对表达量高于二维培养组($P < 0.001$, $P < 0.05$),两组白细胞介素 4、白细胞介素 10、金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶、转化生长因子、角化细胞生长因子 mRNA 相对表达量比较差异无显著性意义($P > 0.05$);④三维培养组白细胞介素 6、白细胞介素 10、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、白细胞介素 8、肝细胞生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 、血管内皮生长因子蛋白表达量高于二维培养组($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$),两组白细胞介素 4、金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶、角化细胞生长因子蛋白表达量比较差异无显著性意义($P > 0.05$);⑤结果表明,水凝胶三维培养环境中的人羊膜间充质干细胞可呈现更好的形态及创面修复相关因子旁分泌生物学效应。

关键词:

水凝胶;羊膜间充质干细胞;二维培养;三维培养;创面修复;旁分泌效应

中图分类号:R459.9;R318.08;R641

Wang Qi, Master candidate, Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Yang Xiaoshuang, Physician, Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Wang Qi and Yang Xiaoshuang contributed equally to the study.

Corresponding author: Wang Dali, Professor, Master supervisor, Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

基金资助:

国家自然科学基金项目(81560313), 项目负责人: 王达利; 国家自然科学基金面上项目(81871570), 项目负责人: 王达利

缩略语:

人羊膜间充质干细胞: human amnion mesenchymal stem cells, hAMSCs

Effects of hydrogel three-dimensional culture on the characteristics of human amniotic mesenchymal stem cells and paracrine effect

Wang Qi, Yang Xiaoshuang, Wang Dali (Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that mesenchymal stem cells can reduce inflammation, promote wound healing, and reduce scar formation in wound healing. However, previous two-dimensional culture environment can lead to differences in gene expression, signal transduction, and morphology because of intracellular contact inhibition.

OBJECTIVE: To investigate whether the ability of wound healing related factors secreted by human amniotic mesenchymal stem cells is affected by two-dimensional or three-dimensional culture environment.

METHODS: The human amniotic mesenchymal stem cells cultured by traditional enzyme digestion method were inoculated in traditional cell culture flask (two-dimensional culture group) and ShakeGel™ 3D hydrogel (three-dimensional culture group) and induced to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes, respectively. The direction of cell differentiation was determined by immunofluorescence staining. Human amniotic mesenchymal stem cells were fused to 70%–80% in two culture environments, and the growth characteristics and morphology of cells were observed under inverted phase contrast microscope and laser confocal microscope. After 24 hours of culture, relative mRNA expression of wound healing-related factors was detected by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. After 48 hours of culture, the protein expression of wound healing-related factors was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Human amniotic mesenchymal stem cells cultured in two-dimensional culture group were flat and spindle-shaped, which was a typical mesenchymal stem cell-like morphology. Human amniotic mesenchymal stem cells in the three-dimensional culture group were round and evenly dispersed in each layer of the hydrogel. (2) Human amniotic mesenchymal stem cells in the three-dimensional culture group exhibited the potential to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. (3) The mRNA expression of interleukin-6, interleukin-8, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, hyaluronic acid, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor in the three-dimensional culture group was significantly higher than that in the two-dimensional culture group ($P < 0.001$, $P < 0.05$). There were no significant differences in the mRNA expression of interleukin-4, interleukin-10, tissue inhibitors of metalloproteinases, matrix metalloproteinase, transforming growth factor and keratinocyte growth factor between three-dimensional and two-dimensional culture groups ($P > 0.05$). (4) The protein expression of interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor, transforming growth factor $\beta 1$ and vascular endothelial growth factor in the three-dimensional culture group was significantly higher than that in the two-dimensional culture ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). There were no significant differences in the protein expression of interleukin-4, tissue inhibitors of metalloproteinases, matrix metalloproteinase, and keratinocyte growth factor between two-dimensional and three-dimensional culture groups ($P > 0.05$). (5) These findings suggest that human amniotic mesenchymal stem cells cultured in three-dimensional hydrogel show better morphology and more encouraging paracrine effect of wound healing related factors than those cultured in traditional two-dimensional culture environment.

Key words: hydrogel; amniotic mesenchymal stem cells; two-dimensional culture; three-dimensional culture; wound repair; paracrine effect

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81560313 (to WDL); the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81871570 (to WDL)

0 引言 Introduction

人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)是具有多向分化潜能的典型间充质干细胞,因其取材方便、细胞增殖能力强、具有低免疫原性及易被伦理接受等优点^[1-2],被广泛应用于组织工程及干细胞治疗。

目前对hAMSCs培养的研究多集中于传统二维环境,二维刚性平面的确可以促进细胞的增殖,但细胞之间存在接触性抑制,限制了细胞生长的空间,导致细胞增殖速度变慢,甚至改变细胞的某些能力。研究表明二维培养环境可改变细胞间信号传导网络,甚至有可能抑制细胞分化,导致体外培养结果与动物转化效果之间存在差异^[3-4]。而且在二维培养环境中生长的细胞形态变扁平,细胞骨架重塑,考虑到细胞结构对功能的影响,这种变化被证实会影响细胞的基因表达及信号传导^[5-7]。三

维细胞培养技术是应用安全、稳定、生物相容性好的天然或合成材料为载体,为细胞提供一个更适合生长的三维微环境^[8-9],可增强细胞的黏附、增殖及细胞因子分泌。

实验以水凝胶为hAMSCs三维生长的载体,通过对比传统培养与三维培养模式探讨培养环境对hAMSCs细胞形态、生长活力、分化能力及旁分泌创面愈合相关因子能力的影响,为hAMSCs在动物移植及临床转化方面的应用提供前期研究资料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞水平的对比实验。

1.2 时间及地点 实验于2016-09-30/2019-05-30在遵义医科大学创伤修复实验室及遵义医科大学附属医院完成。

1.3 材料

1.3.1 羊膜 羊膜于遵义医科大学附属医院产科获得,采

集之前已获得产妇及家属同意并签署了知情同意书。在产科医生协助下,将新鲜羊膜组织存放于含双抗的PBS中,用无菌瓶密封后低温运输,所有组织在4 h内完成处理。所有产妇均为健康剖宫产,研究方案经遵义医科大学附属医院伦理委员会批准。

1.3.2 实验用主要试剂 胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco); DMEM-F12(美国HyClone); II型胶原酶(中国索莱宝); 三维细胞培养水凝胶(ShakeGel™ 3D, 表1); 引物(上海生工); RNA提取试剂盒(南京诺唯赞公司); Tissue Total RNA Isolation Kit(南京诺唯赞); Elisa试剂盒(上海沪鼎); Quant one step qRT-PCR kit(天根生化科技); Anti-OCN antibody、Goat Anti-Mouse IgG、TO-PRO-3 Stai、Anti-PPAR γ antibody、Anti-SOX9 antibody、Anti-Vimentin antibody(艾博抗); 4', 6-diamidino-2-phenylindole、活死细胞染色试剂盒(赛默飞); FITC标记鬼笔环肽(Yeasen); MODM/MADM/MCDM诱导培养基(ScienCell)。

表 1 三维细胞培养水凝胶介绍
Table 1 Hydrogel for three-dimensional culture of cells

项目	三维细胞培养水凝胶
品牌	ShakeGel™ 3D
批号	RK1622001
生产厂家	杭州睿凯生物科技有限公司
组成成分	凝胶液、裂解液
生物相容性	无免疫原性,生物相容性好
医学用途	该产品应用广泛,支持各种体细胞的体外三维培养和体内实验,并可无缝连接体外培养和体内实验,如肿瘤细胞、干细胞体外培养、生长和迁移;病理组织块的体外培养;可直接注射,用于肿瘤建模、干细胞治疗、再生医学研究。体外三维培养产物可直接移植体内

1.3.3 实验用主要仪器 CO₂细胞培养箱(美国 Thermo Forma); 超净台(中国 Sun Jing); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus); 激光共聚焦显微镜(德国 Leica); PCR扩增仪(BIO-RAD); 实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD)。

1.4 实验方法

1.4.1 hAMSCs的提取、培养及鉴定 将新鲜羊膜组织用含双抗的PBS反复冲洗两三遍,去除污血及其他杂质。用眼科剪将羊膜组织剪碎成约1 mm×1 mm的碎片,将剪碎的羊膜组织与0.05%胰蛋白酶一起加入50 mL离心管中,密闭封口后置于水浴摇床中37 ℃ 180 r/min消化30 min。30 min后用200目不锈钢滤网收集未消化完全的羊膜组织,用含1%青链霉素的PBS清洗两三遍后,再次加入0.05%胰蛋白酶,37 ℃ 180 r/min消化30 min,消化结束后再次过滤收集羊膜组织,清洗两三遍。将上述羊膜组织收集在15 mL离心管中,加入等量的0.1% II型胶原酶,37 ℃ 180 r/min水浴摇床消化约1 h,300目细胞过滤筛过滤收集滤液,将滤液37 ℃ 1 500 r/min离心6 min,收集细胞沉淀,即为hAMSCs。经流式细胞术鉴定为间充质干细胞。

1.4.2 hAMSCs的培养

二维培养: 以完全培养基(含体积分数10%胎牛血清、

1%双抗的DMEM/F12)重悬细胞,按1×10⁶接种到T25细胞培养瓶,于37 ℃、体积分数5%CO₂孵箱中培养。

三维培养: 用0.25%胰蛋白酶将生长融合至80%的hAMSCs消化重悬后计数,备用。将预热的ShakeGel™ 3D水凝胶与细胞悬液按体积比1:1加入离心管中混匀,接种于24孔板中,放入37 ℃、体积分数5%CO₂培养箱中孵育约10 min,直至细胞混悬液成为凝胶状。向孔板加入适量完全培养基继续孵育,以使细胞充分贴附在凝胶中。培养24 h后半量换液,此后每两三天更换一次细胞培养基。

1.4.3 两种培养环境下hAMSCs的形态特征 待两种培养环境的hAMSCs融合至70%–80%时,于倒置相差显微镜和激光共聚焦显微镜下观察hAMSCs的生长特点及形态。

1.4.4 三维培养中hAMSCs的细胞活力 将水凝胶中培养36 h的hAMSCs与活死细胞染料孵育,激光共聚焦显微镜下观察细胞状态。

1.4.5 两种培养环境下hAMSCs的分化能力

二维培养: ①成脂诱导分化: 将P2代的hAMSCs以2×10⁵/cm²的细胞密度接种在6孔板中,培养至细胞100%融合或者过融合后,将完全培养基更换成MADM成脂诱导分化培养基,每四五天更换液体,诱导21 d后固定,油红O染色,倒置显微镜下观察检测中性脂质空泡、拍照;②成骨诱导分化: 按照2×10⁵/cm²的细胞密度将hAMSCs接种在事先包被有0.1%明胶的6孔板中,培养至细胞100%融合或者过融合后,用MODM成骨诱导培养基诱导两三周,期间每四五天更换液体。用茜素红进行染色,倒置显微镜下观察钙盐结节、拍照;③成软骨诱导分化: 将P2代消化后的hAMSCs用MCDs成软骨诱导分化培养基重悬,按照1×10⁹ L⁻¹的细胞浓度吸取1 mL转移到15 mL聚丙烯离心管中,室温500×g离心5 min,将含有细胞沉淀的聚丙烯离心管拧松管盖,置于培养箱中培养,每隔3 d更换培养基,持续诱导4周后,利用体积分数4%甲醛对软骨球进行固定,然后石蜡包埋切片、阿利辛蓝染色,倒置显微镜下观察、拍照。

三维培养: 将P2代hAMSCs在含水凝胶的6孔板中适应性培养48 h,分别更换为MODM/MADM/MCDM诱导培养基,每隔3 d换液,连续培养14 d后,通过免疫荧光染色(成脂分化标记物Anti-PPAR γ ; 成骨分化标记物Anti-OCN; 成软骨分化标记物Anti-SOX9)确定细胞分化方向及程度。

1.4.6 实时荧光定量PCR检测 实时荧光定量PCR检测两种培养条件下hAMSCs旁分泌创面愈合相关因子的mRNA表达情况。将hAMSCs按照2×10⁴/cm²接种于两种不同培养条件的24孔板上,培养24 h后,二维培养的hAMSCs用PBS清洗两三遍,加入适量配好的Buffer RL1进行消化、裂解,用移液器反复吹打混匀收集至离心管中备用。三维培养的hAMSCs小心弃去培养液后,按照与水凝胶1:3的比例加入一定体积的水凝胶裂解液,用枪头轻轻吹打数次

后室温裂解3~5 min;待凝胶完全变为液态后,将凝胶细胞混合物移至离心管中,1 500 r/min离心3 min;弃去废液,收集细胞沉淀,根据细胞沉淀的量加入适量已加入 β -巯基乙醇的Buffer RL1[浓度为500 μ L/(2~5) $\times 10^6$ 个细胞],用移液器反复吹打直至液体变澄清看不到细胞团为止。两种裂解液根据RNA提取试剂盒说明书提取RNA,并进行定量检测。反应条件为:92 $^{\circ}$ C 3 min;92 $^{\circ}$ C 10 s;68 $^{\circ}$ C 20 s;共40个循环。以GADPH为内参,检测创面修复相关因子mRNA的表达量,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行半定量分析。检测基因引物序列见表2。

表2 实时荧光定量PCR目的基因引物序列
Table 2 Primer sequences for real-time PCR

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
白细胞介素4	CAT CTT TGC TGC CTC CAA GAA CA	GCC GTT TCA GGA ATC GGA TCA
白细胞介素6	AGG GAG CGA TAA ACA CAA ACT CT	CAG GGA GAA GGC AAC TGG AC
白细胞介素8	AGA GAG CTC TGT CTG GAC CC	GCT TGA AGT TTC ACT GGC ATC TT
白细胞介素10	CCA AAA TCG GAT CTG GGG CT	GGG GGT TGA GGT ATC AGA GG
肝细胞生长因子	CAG GAT TCT TTC ACC CAG GCA	AGG AGG AGA TGC AGG AGG AC
金属蛋白酶组织抑制因子	TCA TTG CTT GTG GAC GGA CC	GGA CAC TGT GCA GGC TTC AG
基质金属蛋白酶	CTT CAG GAT GTG GAG CGA GG	AAG TGC TCG TCG TCG TCA AA
转化生长因子 β 1	GGC TGA TGG AAG TTG TGG GA	CCC AAG CCT CAT CTG CTC AA
碱性成纤维细胞因子	CCC AGA AAA CCC GAG CGA	CGC GGC GTC ACA TCT TCT A
表皮生长因子	GTC TTG ACT CTA CTC CAC CCC	CTC GGT ACT GAC ATC GCT CC
角化细胞生长因子	CCT TCT GCC TGT TGA TTT ATG GA	TGG TGC AAC TTG AGC CTT TC
血管内皮生长因子	GGG AAA GGG GCA AAA ACG AA	GGA GGC TCC AGG GCA TTA GA
透明质酸	GCT TCG AAA TGG GAG TGC TAA	CCG CTC GAG CTA ATT GTA GAA
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

1.4.7 ELISA法检测 ELISA法检测两种培养条件下hAMSCs旁分泌创面愈合相关因子的蛋白表达情况。将hAMSCs按照 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于两种不同培养条件的24孔板上。根据二维培养的细胞情况,细胞贴壁后用PBS清洗两种培养条件下的hAMSCs并更换新鲜培养基,放入细胞培养箱继续培养48 h。48 h后收集两种细胞培养液,1 000 $\times$ g离心20 min,取上清。根据Elisa试剂盒(上海沪鼎)说明书进行加样,在450 nm波长处测定各孔的吸光度值。绘制标准曲线,计算白细胞介素4、白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素10、肝细胞生长因子、金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶、表皮生长因子、转化生长因子 β 1、碱性成纤维细胞因子、角化细胞生长因子、血管内皮生长因子的相应浓度。

1.5 主要观察指标 两种培养环境下hAMSCs的特性及旁分泌创面愈合相关因子的效应。

1.6 统计学分析 统计性结果利用Prism Graphpad7.0软件进行分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料予以正态性和方差齐性检验,独立样本组间比较采用单因素方差分析、独立样本t检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 两种培养条件下hAMSCs的形态特征 倒置显微镜显示,二维培养的hAMSCs呈扁平纺锤状漩涡形紧贴细胞培养瓶瓶壁生长,见图1A;激光共聚焦显微镜和倒置显微镜显示,在水凝胶中三维培养的hAMSCs均匀、多层分散于水凝胶中,呈立体圆形透亮状,见图1B, C。

2.2 三维培养中的hAMSCs的细胞活力 绿色荧光(钙黄绿素-AM)表示细胞处于增殖活跃状态,红色荧光(乙锭二聚体1)表示细胞无活力处于死亡状态。激光共聚焦显微镜显示,水凝胶中的hAMSCs均呈绿色荧光,无红色荧光表达,见图2,说明水凝胶中的hAMSCs均为活细胞,表明此水凝胶对hAMSCs无细胞毒性,且与hAMSCs具有良好的生物相容性。

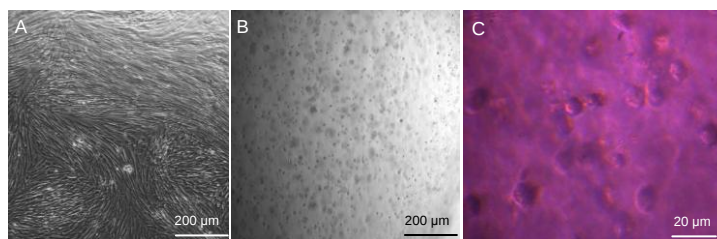
2.3 两种培养条件下hAMSCs的3系诱导分化情况

二维培养: hAMSCs经诱导后油红O染色阳性,可见大小不等的圆形红色颗粒样脂滴呈串珠样分布,说明hAMSCs向脂肪细胞方向分化,见图3A;加入MODM诱导2周后茜素红将矿化结节染成紫红色,表明hAMSCs向成骨细胞分化,见图3B;加入MCDM诱导培养4周后应用阿利辛蓝染色,镜下可见大量内酸性黏多糖被染成蓝色,表明hAMSCs向软骨细胞分化,见图3C。

三维培养: 激光共聚焦结果显示, hAMSCs经诱导后OCN、PPARY、SOX9均表达阳性,表明三维培养的hAMSCs仍然具有3系诱导分化的潜能,见图4~6。

2.4 两种培养环境下hAMSCs创面愈合相关因子mRNA表达情况 三维培养组白细胞介素6、白细胞介素8、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、透明质酸、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子mRNA相对表达量高于二维培养组($P < 0.001$, $P < 0.05$),两组白细胞介素4、白细胞介素10、金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶、转化生长因子、角化细胞生长因子mRNA相对表达量比较差异无显著性意义($P > 0.05$),见图7。

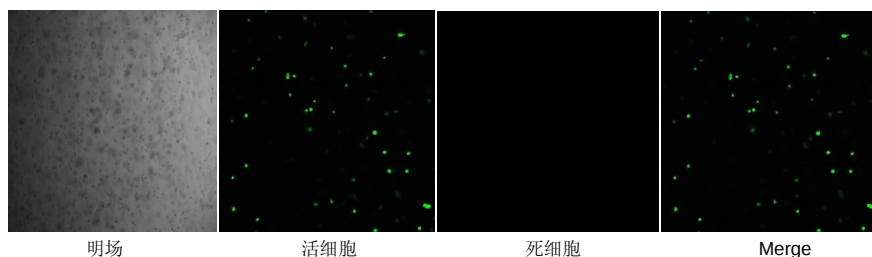
2.5 两种培养环境下hAMSCs创面愈合相关因子蛋白表达情况 三维培养组白细胞介素6、白细胞介素10、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、白细胞介素8、肝细胞生长因子、转化生长因子 β 1、血管内皮生长因子蛋白表达量高于二维培养组($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$),两组白细胞介素4、金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶、角化细胞生长因子蛋白表达量比较差异无显著性意义($P > 0.05$),见图8。



图注: A 为二维培养条件下的人羊膜间充质干细胞(倒置显微镜, ×4); B(激光共聚焦显微镜, ×40)、C(倒置显微镜, ×400) 为水凝胶中三维培养的人羊膜间充质干细胞

图 1 不同培养条件下人羊膜间充质干细胞的形态

Figure 1 Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells under different culture conditions



图注: 水凝胶中的人羊膜间充质干细胞均呈绿色荧光, 无红色荧光表达

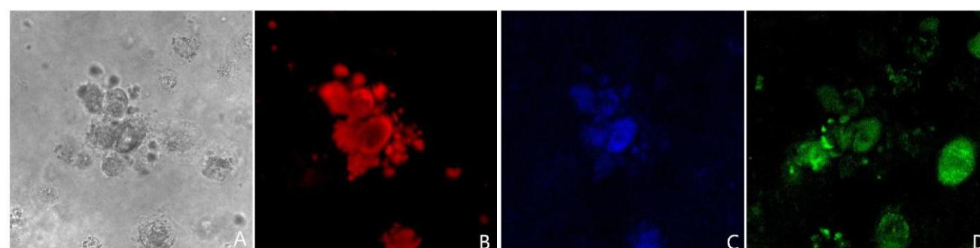
图 2 三维培养条件下人羊膜间充质干细胞的活力(×100)

Figure 2 Cell viability of human amniotic mesenchymal stem cells under three-dimensional culture condition (×100)



图 3 二维培养条件下人羊膜间充质干细胞的诱导分化结果

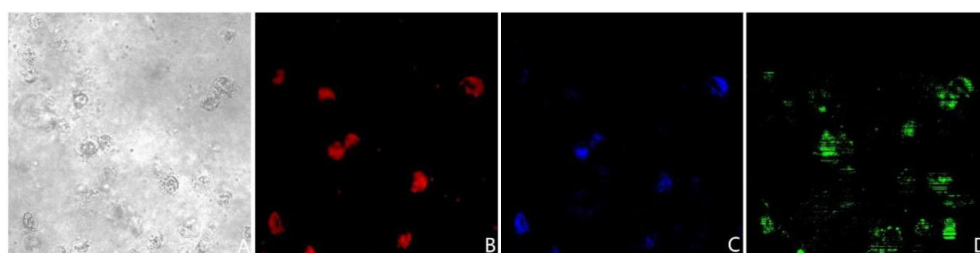
Figure 3 Differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells induced under two-dimensional culture condition



图注: A 为明场; B 为细胞核染色; C 为成脂标记物 PPAR γ 免疫荧光染色阳性; D 为细胞骨架染色

图 4 三维培养环境下人羊膜间充质干细胞的成脂诱导分化(免疫荧光染色, ×200)

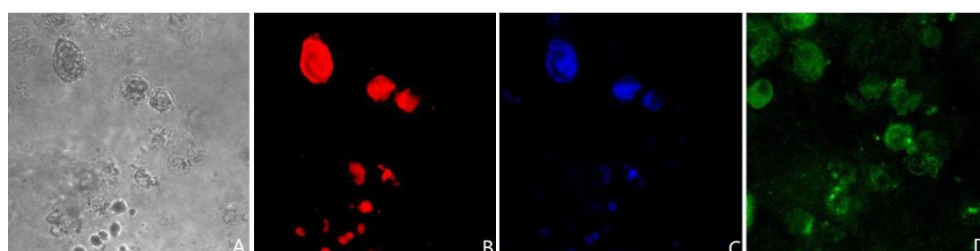
Figure 4 Immunofluorescence staining for adipogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells under three-dimensional culture condition (×200)



图注: A 为明场; B 为细胞核染色; C 为成骨标记物 OCN 免疫荧光染色阳性; D 为细胞骨架染色

图 5 三维培养环境下人羊膜间充质干细胞成骨诱导分化(免疫荧光染色, ×200)

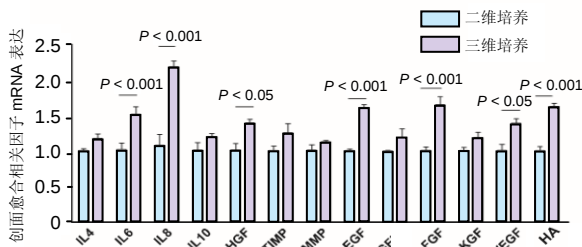
Figure 5 Immunofluorescence staining of osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells under three-dimensional culture condition (×200)



图注: A 为明场; B 为细胞核染色; C 为成骨标记物 SOX9 免疫荧光染色阳性; D 为细胞骨架染色

图 6 三维培养环境下人羊膜间充质干细胞的成软骨诱导分化(免疫荧光染色, ×200)

Figure 6 Immunofluorescence staining of chondrogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells under three-dimensional culture condition (×200)



图注: IL4 为白细胞介素 4, IL6 为白细胞介素 6, IL8 为白细胞介素 8, IL10 为白细胞介素 10, HGF 为肝细胞生长因子, TIMP 为金属蛋白酶组织抑制因子, MMP 为基质金属蛋白酶, EGF 为表皮生长因子, TGF 为转化生长因子 β 1, bFGF 为碱性成纤维细胞因子, KGF 为角化细胞生长因子, VEGF 为血管内皮生长因子, HA 为透明质酸

图 7 不同培养环境下人羊膜间充质干细胞创面愈合相关因子 mRNA 相对表达量

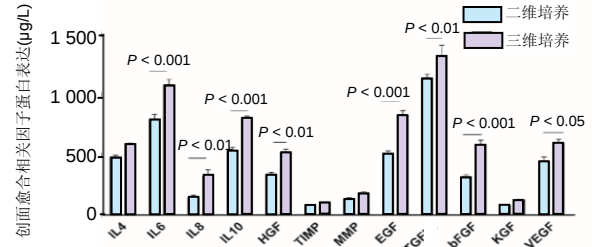
Figure 7 Relative mRNA expression of wound healing related factor under different culture conditions

3 讨论 Discussion

随着研究的深入,人们逐渐意识到细胞结构对其功能的重要性,并确定了传统二维培养体系的局限性。现在有许多方法可以改变细胞的生长环境以促进三维细胞生长,如利用具有三维结构的生物材料使细胞负载其中并在体外环境培养,为细胞的生长、分化和功能提供合适的微环境,以及体外构建类似体内组织的能力,鼓励细胞与相邻细胞形成复杂的相互作用,接收和发送信号^[10-13]。细胞的三维培养模式大致分为无支架或基于支架的培养体系,支架通常是由天然或合成材料制成,其中以胶原蛋白、纤维蛋白、透明质酸等天然材料应用最为普遍^[14-16]。通过统计发现,以水凝胶为 3D 培养体系的支架在组织工程学中的应用最为广泛,其次是细胞外基质片、聚集体/球状体,然后是构建组织胶原^[17]。

在三维培养环境中,细胞的受体和黏附分子可以更自然、更均匀地分布在细胞表面,以加速细胞间信号的传递。此次实验在细胞培养时发现,水凝胶三维环境中的 hAMSCs 比二维环境中的黏附能力增强,仅需 4-6 h 的时间 hAMSCs 便从凝胶顶部均匀的向各层黏附,并逐渐向周围伸出伪足;而传统二维环境中的 hAMSCs 培养 12 h 后才会黏附在培养瓶壁上,与文献报道一致^[18]。三维培养的 hAMSCs 比传统二维培养具有更高的细胞活力及存活率,证明水凝胶与其有较好的生物相容性。在 3 系诱导分化实验中,将三维培养环境下的 hAMSCs 分别进行成脂、成骨、成软骨诱导分化 2 周后,用脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞的特异性免疫荧光标记物(PPAR γ /OCN/SOX9)染色,发现 3 种目标细胞的特异性标记物均表达阳性,提示三维培养环境下的 hAMSCs 仍然具有一定的诱导分化潜能;但是诱导分化后的 hAMSCs 未像二维培养时出现类似脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞的形态,这或许与 3D 水凝胶微环境中特定的细胞外基质蛋白会影响干细胞分化有关。

目前研究一致认为间充质干细胞在创面愈合中的生物



图注: IL4 为白细胞介素 4, IL6 为白细胞介素 6, IL8 为白细胞介素 8, IL10 为白细胞介素 10, HGF 为肝细胞生长因子, TIMP 为金属蛋白酶组织抑制因子, MMP 为基质金属蛋白酶, EGF 为表皮生长因子, TGF 为转化生长因子 β 1, bFGF 为碱性成纤维细胞因子, KGF 为角化细胞生长因子, VEGF 为血管内皮生长因子

图 8 不同培养环境下人羊膜间充质干细胞创面愈合相关因子蛋白表达量

Figure 8 Protein expression of wound healing related factor secreted by human amniotic mesenchymal stem cells under different culture conditions

学效应主要依赖其旁分泌效应^[19-20]。以往的研究主要是基于传统二维培养环境的 hAMSCs,发现体外研究结果往往优于体内组织修复效果,除了动物实验个体差异的影响,单纯局部注射的 hAMSCs 很快被吞噬细胞吞噬失活,严重地影响了其组织修复效果^[21]。为了对比研究 hAMSCs 在不同环境下的旁分泌能力,检测了 hAMSCs 分泌某些创面愈合相关因子的表达量。检测结果表明,在水凝胶中三维培养的 hAMSCs 创面愈合相关因子白细胞介素 6、白细胞介素 8、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、透明质酸、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子的 mRNA 相对表达量比二维培养时增加;在水凝胶中三维培养的 hAMSCs 创面愈合相关因子白细胞介素 6、白细胞介素 10、表皮生长因子、碱性成纤维细胞因子、白细胞介素 8、肝生长因子、转化生长因子 β 1、血管内皮生长因子的蛋白表达比二维培养时增加,提示在水凝胶三维培养环境中 hAMSCs 的旁分泌效应增强。这些结果与相关研究结果一致,LEE 等^[22]报道通过钙依赖的 E-cadherin 相互作用形成的间充质干细胞球面体,可改善大鼠心肌梗死模型的旁分泌活性和治疗效果,而且类似的旁分泌作用也在脂肪来源的^[23]、脐带来源的^[24]、骨髓来源的间充质干细胞三维球状体培养实验中被验证^[25]。这可能与三维环境允许更大的细胞间接触,导致细胞间信号增加,促进发育过程并允许细胞分化成更复杂的结构有关,使细胞的活力更加接近其生理状态,有利于其旁分泌效应的发挥。

总之,通过一系列研究发现水凝胶三维培养体系为 hAMSCs 提供了更合适的微环境,不仅形态上最大限度地模拟了体内组织细胞的生长形式,还解除了刚性平面对体外细胞培养的不利影响,为后续干细胞的动物移植提供了新思路。另外,将三维培养技术与细胞生物学中的组织再生技术结合使用,将为创建用于基础研究和药物发现的人类组织模拟物提供新的机会,这些模型的应用在组织工程与药物研究中具有重大意义。

作者贡献: 杨晓双进行实验设计, 实验实施为王旗、杨晓双, 实验评估为王达利, 资料收集为杨晓双, 王旗成文, 王达利审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81560313)、国家自然科学基金面上项目(81871570)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经遵义医科大学统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] WOLBANK S, PETERBAUER A, FAHRNER M, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng.* 2007;13(6):1173-1183.
- [2] BAILO M, SONCINI M, VERTUA E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation.* 2004;78(10):1439-1448.
- [3] HARA J, TOTTORI J, ANDERS M, et al. Trehalose effectiveness as a cryoprotectant in 2D and 3D cell cultures of human embryonic kidney cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(3): 609-616.
- [4] YU HS, LEE EJ, SEO SJ, et al. Feasibility of silica-hybridized collagen hydrogels as three-dimensional cell matrices for hard tissue engineering. *J Biomater Appl.* 2015;30(3): 338-350.
- [5] MIKOS AG, SAKAKINOS G, LEITE SM, et al. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials.* 1993;14(5):323-330.
- [6] ISHAUG-RILEY SL, CRANE-KRUGER GM, YASZEMSKI MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials.* 1998;19(15): 1405-1412.
- [7] HOLY CE, YAKUBOVICH R. Processing cell-seeded polyester scaffolds for histology. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50(2):276-279.
- [8] ZANONI M, PICCININI F, ARIENTI C, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep.* 2016; 6:19103.
- [9] FROELICH K, HAEGER JD, HEGER J, et al. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol.* 2016;21(3-4): 89-98.
- [10] KNIGHT E, PRZYBORSKI S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat.* 2015;227(6):746-756.
- [11] THOMAS CH, COLLIER JH, SFEIR CS, et al. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(4): 1972-1977.
- [12] VERGANI L, GRATAROLA M, NICOLINI C. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int J Biochem Cell B.* 2004;36(8): 1447-1461.
- [13] JANMEY PA, MILLER RT. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Biol.* 2011;124 (Pt 1):9-18.
- [14] SHEKARAN A, LAM A, SIM E, et al. Biodegradable ECM-coated PCL microcarriers support scalable human early MSC expansion and in vivo bone formation. *Cytotherapy.* 2016;18(10):1332-1344.
- [15] MAGUIRE T, NOVIK E, SCHLOSS R, et al. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93(3): 581-591.
- [16] OCCHETTA P, CENTOLA M, TONNARELLI B, et al. High-Throughput Microfluidic Platform for 3D Cultures of Mesenchymal Stem Cells, Towards Engineering Developmental Processes. *Sci Rep.* 2015; 5:10288.
- [17] ANTONI D, BURCKEL H, JOSSET E, et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517-5527.
- [18] LAM J, LOWRY WE, CARMICHAEL ST, et al. Delivery of iPS-NPCs to the Stroke Cavity within a Hyaluronic Acid Matrix Promotes the Differentiation of Transplanted Cells. *Adv Funct Mater.* 2014; 24(44):7053-7062.
- [19] LIANG X, DING Y, ZHANG Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.* 2014;23(9):1045-1059.
- [20] SONG M, HEO J, CHUN JY, et al. The paracrine effects of mesenchymal stem cells stimulate the regeneration capacity of endogenous stem cells in the repair of a bladder-outlet-obstruction-induced overactive bladder. *Stem Cells Dev.* 2014; 23(6):654-663.
- [21] 岳凤文. IL-10-hAMSCs对巨噬细胞表型转化及共培养上清液对成纤维细胞的影响研究[D]. 遵义:遵义医学院, 2018.
- [22] LEE EJ, PARK SJ, KANG SK, et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction. *Mol Ther.* 2012;20(7): 1424-1433.
- [23] RETTINGER CL, FOURCAUDOT AB, HONG SJ, et al. In vitro characterization of scaffold-free three-dimensional mesenchymal stem cell aggregates. *Cell Tissue Res.* 2014; 358(2):395-405.
- [24] HO SS, MURPHY KC, BINDER BY, et al. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. *Stem Cell Transl Med.* 2016;5(6):773-781.
- [25] AGGARWAL S, PITTENGER MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105(4):1815-1822.