

·基础研究·

人羊膜上皮细胞分离的正交法研究*

张 岚¹ 舒 峻¹ 蔡 哲^{1,3} 付桂香¹ 徐 杨² 高 艳² 崔晓惠²

摘要 目的:研究人羊膜上皮细胞(hAECs)分离的适宜条件。方法:采用正交试验的方法,以 $L_9(3^4)$ 正交表安排影响hAECs分离的几个主要因素,每组实验所得细胞计数并培养24h后,收集悬浮细胞计算细胞贴壁率,培养7d计算扩增细胞数,以此为指标分析各因素对hAECs分离的影响。结果:胰蛋白酶的浓度及消化次数对细胞得量均有显著影响($P<0.05$)。结论:应用正交试验法得出hAECs分离的适宜条件为:胰蛋白酶液与羊膜组织体积比为1:1,胰蛋白酶浓度0.25%,消化时间10min/time,消化4次。

关键词 人羊膜;上皮细胞;分离方法;正交试验法

中图分类号:R338 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0352-03

Orthogonal research on separation of human fetus amnion epithelial cells/ZHANG Lan, SHU Jun, CAI Zhe, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 352—354

Abstract Objective: To study the appropriate conditions of separation of human fetus amnion epithelial cells (hAECs). **Method:** The orthogonal test was used to arrange those several major factors which impact the separation of hAECs as $L_9(3^4)$ orthogonal table. After counting numbers, the hAECs from different test groups were cultivated for 24h, then collected the suspended cells and calculated the adherence rate. The number of proliferated cells were counted after 7 days, and all these data were used to analyze the affection of the factors on the hAECs separation. **Result:** The concentration of trypsin and the times of trypsinization were the key factors which impacted on the hAECs separation ($P<0.05$). **Conclusion:** The appropriate conditions of the hAECs separation are as follows: the volume of 0.25% trypsin is equal to the amnion;trypsinizing four times,10 min/time.

Author's address Institute of Clinical-Medicine Science China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029

Key words human amnion; epithelial cells; separation; orthogonal test

人类羊膜是来源于胎儿的胚胎早期产物,位于胎盘的最内层,厚约0.02—0.05mm,透明、有韧性,无血管、神经和淋巴管。由羊膜上皮、基底膜和基质组成,其抗原性极低。近年来研究发现,诸多学者对羊膜组织细胞进行了一系列的生物学特性及临床研究,Sankar等^[1]研究证实羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)具有修复神经系统损伤的作用。hAECs可分泌多种神经营养因子,促进神经元的存活及其轴突生长^[2]。羊膜组织中存在具有分化潜能的细胞,提示hAECs具有干细胞特性^[3]。近年也有学者先后报道了移植hAECs可以治疗神经退行性病变^[4-5]。羊膜组织细胞在临床也已成功应用于眼部疾病,神经系统疾病,硬脊膜损伤,内分泌疾病及并发症,烧伤等方面。由于羊膜取材方便、易于分离,对其研究不会涉及伦理道德问题,其独特的生物学特性预示着hAECs有广阔的临床应用前景。hAECs的定向分化及其临床应用的前提是科学有效地分离培养出足量、稳定的hAECs。传统的分离法细胞得率较低,本实验在前期培养工作的基础上,采用正交设计对hAECs分离条件进行了进一步摸索。

1 材料与方法

1.1 材料

羊膜来自中日友好医院妇产科健康产妇(HIV、甲肝、乙肝,以及梅毒等血清学反应显示为阴性的剖宫产分娩产妇的胎膜),并经产妇产授权同意。培养基DMEM/F12(美国Gibco公司),胎牛血清(美国Gibco公司),青霉素100U/ml,链霉素100 μ g/ml,胰蛋白酶(trypsin)(美国Gibco公司)

1.2 正交试验表头设计

表头设计见表1,以 $L_9(3^4)$ 正交表安排影响hAECs的几个主要因素。

1.3 羊膜上皮细胞的分离

无菌分离羊膜,以含有双抗(100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)的生理盐水反复漂洗清除血凝块。

* 基金项目:北京市自然科学基金重点项目(5041002),北京市科委重大研究课题(D07050701350704),国家自然科学基金(30471773)

1 中日友好医院临床医学研究所,北京,100029

2 中日友好医院妇产科

3 通讯作者

作者简介:张岚,女,副主任技师

收稿日期:2008-09-12

表1 正交设计表 L9(34)

因素水平	胰蛋白酶 加入量(倍)A	消化时间 (min)B	胰蛋白酶浓度 (%)C	消化次数 (次)D
1	0.5	10	0.125	2
2	1.0	15	0.250	3
3	1.5	20	0.500	4

将漂洗干净的羊膜均分3块(每张羊膜做3组试验)置于含10×双抗(1000U/ml青霉素、1000μg/ml链霉素)的D-Hanks液中浸泡1.5h后,按表2的实验安排进行各组胰蛋白酶消化,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基及时终止消化,消化残液以200目细胞筛过滤,收集细胞悬液用台盼兰染色并计数活细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,接种至75cm²培养瓶,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,置于37℃恒温、5%CO₂、饱和湿度培养箱静置培养。

表2 人上皮细胞分离条件正交实验安排及结果

试验号	因素				分离细胞 数($\times 10^6$)	贴壁率 (%)	扩增细胞 数($\times 10^6$)
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.45	30.25	0.32
2	1	2	2	2	8.50	56.34	9.50
3	1	3	3	3	33.0	50.00	25.0
4	2	1	2	3	24.4	74.13	51.0
5	2	2	3	1	13.0	49.15	7.66
6	2	3	1	2	0.325	14.61	0.12
7	3	1	3	2	29.0	58.30	23.8
8	3	2	1	3	19.5	28.96	7.20
9	3	3	2	1	0.075	20.50	0.023
K1	41.95	53.85	20.28	13.53			
分离 K2	37.73	41.00	32.98	37.83			
细胞 K3	48.58	33.40	75.00	76.90			
数 R	10.85	20.45	42.02	63.37			
K1	136.59	162.68	73.82	99.9			
贴壁 K2	137.89	134.45	150.97	129.25			
率 K3	107.76	85.11	157.45	153.09			
R	30.13	77.57	83.63	53.19			
K1	34.82	75.12	7.64	8.003			
增殖 K2	58.78	24.36	60.52	33.42			
率 K3	31.02	25.14	56.46	83.20			
R	27.76	50.76	52.88	75.20			

1.4 培养细胞的形态学观察

培养第2d换液,收集悬浮细胞,0.2%台盼兰染色并计数悬浮细胞数,计算每组细胞的贴壁率。每天倒置显微镜(Olympus)下观察细胞形态变化及其生长、增殖状况。细胞常规培养7d后,收集细胞并台盼兰计数活细胞,比较各组细胞扩增情况。

1.5 统计学分析

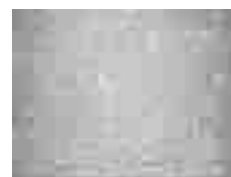
用正交设计的极差及方差分析对实验数据进行分析。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学特征

原代培养24h后,刚贴壁的细胞呈圆形,折光性强,随后细胞胞质逐渐展开,折光性减弱。羊膜上皮细胞完全贴壁后呈扁平不规则多角形,大小较为一致,胞浆丰富,细胞核大,呈圆形或卵圆形,有2—3

个核仁,符合上皮细胞体外培养的一般形态特征。细胞贴壁2d后增殖明显加快,细胞进入指数生长期,5—7d左右形成单层,细胞融合成片,呈膜状生长,生长成片后状如铺路石(图1,2)。

图1 hAECs培养24h
半贴壁倒置显微镜($\times 200$)图2 hAECs培养3d
倒置显微镜($\times 200$)

2.2 正交试验结果分析

正交试验结果及极差分析可见(表2),各指标受四个因素的影响结果不完全相同,消化羊膜所得细胞数指标极差最大的为D因素,其各因素影响大小为 $D > C > B > A$,以 $A_3B_1C_3D_3$ 组合为最佳,贴壁率指标分析的因素影响大小及最优方案分别为 $C > B > D > A$, $A_2B_1C_3D_3$,原代细胞扩增7d后指标分析影响大小为 $D > C > B > A$,最优方案为 $A_2B_1C_2D_3$ 。

方差分析表明消化次数及胰蛋白酶浓度的差异对消化羊膜所得细胞指标有显著性差异($P < 0.05$),其余均无显著性差异,见表3。因此,人羊膜分离hAECs适宜方法为: $A_2B_1C_3D_3$ 和 $A_2B_1C_2D_3$,由于胰蛋白酶浓度的差异对细胞得量有显著性差异,所以应对胰蛋白酶浓度进一步考察。

表3 各种因素对hAECs得率影响的方差分析

项目	方差来源	离均差平方	自由度	方差	F值	P值	因素影响
细胞量	A	19.94	2	9.970	1.00	>0.05	不显著
	B	70.95	2	35.48	3.559	>0.05	不显著
	C	546.81	2	273.41	27.42	<0.05	显著
	D	681.41	2	340.71	34.17	<0.05	显著
	误差	19.94					
贴壁率	A	193.41	2	96.71	1.00	>0.05	不显著
	B	1027.61	2	513.81	5.313	>0.05	不显著
	C	1443.12	2	721.56	7.461	>0.05	不显著
	D	473.22	2	236.61	2.447	>0.05	不显著
	误差	193.41					
扩增细胞数	A	151.02	2	75.51	1.00	>0.05	不显著
	B	563.91	2	281.96	3.734	>0.05	不显著
	C	577.35	2	288.68	3.823	>0.05	不显著
	D	975.49	2	487.75	6.459	>0.05	不显著
	误差	151.02					

注: $F_{0.01(2,2)}=9.00$; $F_{0.05(2,2)}=19$; $F_{0.01(2,2)}=99$

2.3 胰蛋白酶浓度的确定试验

两种试验的条件分别是:第一组:胰蛋白酶消化液体积为羊膜组织体积1倍,消化10min,胰蛋白酶浓度0.25%,消化4次;第二组:胰蛋白酶消化液体积为羊膜组织体积1倍,消化10min,胰蛋白酶浓度0.5%,消化4次。试验方法同1.3,结果见表4,从两组试验的三项指标显示,胰蛋白酶浓度0.25%分离细胞效果明显优于0.5%。人羊膜上皮细胞分离方法

表4 两种胰酶浓度对分离方法影响的比较

胰酶浓度 (%)	细胞得量 ($\times 10^7$)	贴壁率 (%)	扩增细胞数 ($\times 10^7$)
0.25	6.20	62.9	4.9
0.50	8.45	42.5	2.1

最适宜条件为:胰蛋白酶消化液与羊膜组织体积比为 1:1,胰蛋白酶浓度为 0.25%,消化时间 10min/次,消化 4 次。

3 讨论

人羊膜上皮细胞的生物学特性决定了它的临床应用基础。近年来有学者用 BDNF 基因修饰的人羊膜上皮细胞移植治疗帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠时发现, hAECs 移植对 PD 模型大鼠的行为有一定改善, hAECs 可以作为一种治疗 PD 的供体细胞^[6]。还有人将人羊膜细胞移植入 MPTP 所致的大鼠 PD 模型脑内纹状体, 检测 MPTP 对黑质内细胞的毒性、移植细胞的存活情况和内源性神经细胞再生, 以及纹状体内 BDNF 和 GDNF 水平。结果显示人羊膜细胞表达神经前体细胞的标志并且能分化成神经细胞、DA 能神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, TH 阳性神经细胞在移植治疗组明显增加, 免疫组化显示移植的细胞在 PD 大鼠脑内存活, 侧脑室下区的 BrdU 阳性细胞和纹状体内的神经营养因子水平明显增加^[5]。不仅如此, 人羊膜上皮细胞的多潜能特性决定了它的应用基础广泛, 也同时对分离获得大量人羊膜上皮细胞提出了更高的要求。

人羊膜上皮细胞体外培养能否成功很大程度取决于能否获得足够数量活力好的细胞。原代培养分为组织块培养和酶消化分离法培养, 组织块培养由于不是每个组织块都能培养成功, 且容易混杂有成纤维细胞污染, 培养形成单层的时间较长, 不利于快速大量获取细胞, 难以满足组织工程的需要, 故本实验我们选择用酶消化法。

在酶消化法的应用中发现, 胰蛋白酶对细胞的损伤大, 消化时间过长, 消化下来的细胞不易贴壁生长, 细胞成活率低。消化时间缩短又不能得到足够量的细胞。为了解决消化酶对细胞的损伤, 曾采用分步

多次消化方法, 此法获得了足量且成活率较高的上皮细胞, 但分离步骤繁琐, 整个操作过程颇长, 实际操作易造成污染。为了获得最佳的分离方法, 本研究采用正交试验的方法进一步研究。

细胞分离适宜条件的摸索需要进行长期大量复杂的工作。正交试验法能够大幅度减少试验次数而并不会降低试验可行性。正交试验设计是一种高效、快速的多因素分析方法, 它通过一套规格化的正交表和交互作用表, 使各因素得以合理安排, 并对试验结果进行科学分析, 获得有关信息。曾有将正交试验法成功运用于细胞培养条件摸索的报道^[7], 本实验室在前期试验的基础上设计了 3 水平 4 因素正交表, 按 $L_9(3^4)$ 条件安排试验, 分析了影响 hAECs 分离培养的 4 个主要条件。试验结果表明, 首次将正交试验法应用于细胞分离条件的摸索, 达到了较好的预期目的。

参考文献

- [1] Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research [J]. *Neuroscience*, 2003, 118(1):11—17.
- [2] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi K, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. *Neurosci Res*, 2000, 62(4):585—590.
- [3] 蔡哲, 舒峻, 潘琳, 等. 人羊膜组织细胞的神经干细胞特性形态学研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(12):1077—1081.
- [4] 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's disease: a potential source of donor for transplantation therapy [J]. *Exp Neurol*, 2000, 165:27—34.
- [5] Kong XY, Cai Z, Pan L, et al. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice [J]. *Brain Res*, 2008, 18(1205):108—115.
- [6] 谢慧芳, 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.
- [7] 张怀勤, 季亢挺, 杨德业, 等. 内皮祖细胞培养条件的正交设计研究 [J]. *温州医学院学报*, 2005, 35(4):261—264.