维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0227-04

人羊膜上皮细胞在纤维蛋白支架和细胞生长因子作用下的研究

李 玮[1]，漆洪波[2]，陈 蓉[1]，周 辉[1]

（1. 成都市妇幼保健院妇产科，成都 610031；2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆 400016）

【摘 要】目的：以纤维蛋白凝块为支架构建人羊膜上皮细胞（HAEC）生长模型，观察表皮生长因子（EGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、转化生长因子 β_1（TGF-b1）对 HAEC 生长的影响。方法：在体外构建的纤维蛋白支架上培养 HAEC，采用倒置显微镜、Giemsa 染色和扫描电子显微镜观察 HAEC 的生长情况。采用 TUNEL 法检测 EGF、bFGF 和 TGF-β_1 对纤维蛋白支架上 HAEC 凋亡的影响。结果：HAEC 在构建的纤维蛋白支架上生长。EGF 组和 bFGF 组 HAEC 凋亡较对照组明显减少（$P<0.05$），TGF-β_1 组 HAEC 凋亡较对照组明显增加（$P<0.05$）。结论：HAEC 能在构建的纤维蛋白支架上良好生长，EGF、bFGF 可抑制 HAEC 凋亡，TGF-β_1 则促进 HAEC 凋亡。

【关键词】人羊膜上皮细胞；纤维蛋白；生长因子

【中国图书分类法分类号】R714.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-10-17

Study of the human amniotic epithelial cells on the fibrin clot and cellular growth factor

LI Wei, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, Chengdu Maternal and Child Health Care Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To establish the model of cultured human amniotic epithelial cells (HAECs) on the fibrin clot in order to observe the effect of EGF, bFGF and TGF-β_1 on HAEC. *Methods*: The cultivated HAECs on the formulated fibrin clot were examined by phase contrast microscopy, Giemsa staining and scanning electron microscopy. The effect of growth factor (EGF, bFGF, and TGF-β_1) on the apoptosis of HAECs was measured by TUNEL. *Results*: HAECs generated on the formulated fibrin clot in vitro. HAECs exposed to EGF or bFGF showed a lower rate of apoptosis than the control group ($P<0.05$), however, HAECs exposed to TGF-β_1 showed an opposite effect ($P<0.05$). *Conclusion*: HAECs generate well on the formulated fibrin clot in vitro. Exposure to EGF or bFGF decreases the apoptosis rate of HAEC, however, exposure to TGF-β_1 increases the apoptosis.

【Key words】HAEC; fibrin clot; growth factor

前期的体外研究发现，构建的纤维蛋白支架可有效封闭未足月胎膜早破的破口[1]，但胎膜破口封闭后，羊膜上皮细胞能否在纤维蛋白支架上生长尚待研究。王一飞等研究了利用制备的血纤维蛋白凝块作为巨噬细胞和 3T3 成纤维细胞生长的支架，构建体外三维组织模型的可能性，结果 3T3 成纤维细胞在血纤维蛋白凝块支架上生长、分化良好[2]。因此我们推测构建封闭胎膜破口的纤维蛋白凝块支架可能有助于羊膜细胞的生长和破口愈合。胎膜破裂可能与羊膜组织中细胞生长因子如 bFGF、TGF-b、EGF 的含量下降、进而引起人羊膜上皮细胞（HAEC）凋亡，羊膜修复与生长因子的关系及相互作用，目前尚不清楚。本实验观察 HAEC 在纤维蛋白支架上的生长情况及加入生长因子 EGF、bFGF、TGF-β_1 后对 HAEC 生长及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株：Wish 株（中国科学院上海细胞生物学研究所），即人羊膜上皮细胞株。

作者介绍：李 玮（1968- ），女，主治医师，硕士研究生，主要研究方向：高危妊娠。

维普资讯 http://www.cqvip.com

主要试剂：采用血小板，冷沉淀（重庆市中心血站）；凝血酶（雨珠集团苏州新宝制药厂）；6-氨基己酸（无锡市第七制药有限公司）；抑肽酶（杭州澳亚生物技术有限公司）；氯化钙，无菌注射用水（淄博市临淄立山无机化）；10%小牛血清的 RPMI 1640 双抗液（青霉素 1×10^6U/L，链霉素 100mg/L）（美国 Pepro Tech 公司）；胰蛋白酶（美国 Sigma 公司）；外源性细胞生长因子 EGF、bFGF、TGF-β1（美国 Pepro Tech 公司）；TUNEL 试剂盒（德国 Boehringer Mannheim 公司）；液体 DAB 酶底物显色试剂盒（北京中山生物有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 纤维蛋白支架的制备 无菌条件下，1 支注射器内抽入 2.5ml 冷沉淀，另 1 支注射器内混匀有 2.5ml 凝血酶、抑肽酶 3000KU/ml、氯化钙，连接三通管同时注入末端，混合后形成半凝胶纤维蛋白块，于培养皿中刀片将其切成大小约 1cm×1cm 小块，置入 25cm² 培养瓶中。

1.2.2 人羊膜上皮细胞的接种培养 取生长良好的人羊膜上皮细胞，生理盐水漂洗两次，加入 0.25%胰蛋白酶消化后，培养液终止消化，离心，弃去液体，加入 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释成 1×10^7/L 细胞悬液，接种 5ml 于已固定有纤维蛋白块的培养瓶中，置入 37℃，5% CO_2 恒温培养箱中培养。

1.2.3 细胞生长因子的添加 EGF 组：将 1×10^6/L 细胞悬液 5ml 轻轻加入已固定有纤维蛋白块的 25cm² 培养瓶中加入终浓度 10ng/ml 的 EGF，置入 37℃，5% CO_2 恒温培养箱中培养 48h。bFGF 组：加入终浓度 10ng/ml 的 bFGF，其余条件同 EGF 组。TGF-β1 组：加入终浓度 1ng/ml 的 TGF-β1，其余条件同 EGF 组。对照组：细胞浓度数值及培养条件与以上生长因子组相同。每组设 10 瓶。

1.3 检测方法

1.3.1 Giemsa 染色 接种人羊膜上皮细胞 2 天，吸弃培养液，PBS 漂洗 2 次，用固定液（甲醇：冰醋酸 = 3∶1）固定 30min，Giemsa 工作液染色 20min，蒸馏水漂洗后，倒置显微镜下观察并拍照。

1.3.2 扫描电子显微镜观察 接种羊膜上皮细胞培养 2 天，吸弃培养液，PBS 漂洗细胞两次，2%戊二醛固定液固定。系列浓度的丙酮和水脱水，CO_2 吹干喷金后扫描电子显微镜观察并拍照。

1.3.3 TUNEL 法检测细胞生长因子 对纤维蛋白支架上 HAEC 凋亡，高倍下 40×10 测试网格记数 10 个不同视野的凋亡细胞、凋亡细胞核数 / 总细胞核数即细胞凋亡指数。

1.4 统计学方法

每组凋亡采用 χ^2 检验，用 SPSS13.0 软件进行统计分析。$P<0.05$ 差异有显著性。

2 结 果

2.1 纤维蛋白支架上人羊膜上皮细胞的生长及 Giemsa 染色观察

纤维蛋白支架呈细网状，较透亮，在不同视野、纤维蛋白支架上均有人羊膜上皮细胞的生长，细胞多呈圆形。纤维蛋白支架 Giemsa 染色后变为橘黄色，羊膜上皮细胞染色后呈紫蓝色，细胞核蓝色，随细胞数目增多，蓝色加深（见图 1）。



图 1 人羊膜上皮细胞在纤维蛋白支架上生长 Giemsa 染色(×200)

2.2 纤维蛋白支架上羊膜上皮细胞生长的扫描电镜形态学观察

纤维蛋白支架呈不规则的立体空间结构，表面纵横交错，多层次网络状。羊膜上皮细胞生长较好，细胞呈凸起球状物，绒毛状。细胞之间有较长的伪足等多种形状的接触（图 2）。



图 2 人羊膜上皮细胞间的细胞接触 ×2000

2.3 生长因子作用下纤维蛋白支架上羊膜上皮细胞凋亡（表 1）

凋亡细胞核染色成棕黄色，核固缩或边缘化，部分可见凋亡小体。EGF 及 bFGF 组纤维蛋白支架上羊膜上皮细胞数较对照组多，凋亡细胞明显减少（$P<0.05$）；相反，TGF-β1 组纤维蛋白支架上羊膜上皮细胞数较对照组少，凋亡细胞明显增多（$P<0.05$）（图 3~6）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 EGF、bFGF、TGF-β1 及对照组细胞凋亡情况

分组	细胞总数	正常细胞数	凋亡细胞数	AI	χ^2	P
EGF组	408	405	3	0.007353	9.831	<0.05
bFGF组	324	322	2	0.006173	9.208	<0.05
TGF-β_1组	108	90	18	0.166667	8.584	<0.05
对照组	123	117	6	0.04878		



图 3 EGF 组细胞凋亡观察(×400)



图 4 bFGF 组细胞凋亡观察(×400)



图 5 TGF-β_1 组细胞凋亡观察(×400)



图 6 对照组细胞凋亡观察(×400)

3 讨 论

近年来，由于生物材料具有可塑性强、可吸收、可降解以及不引发机体的免疫反应等特点[5]受到研究者广泛的关注并广泛应用于临床修补和细胞培养的载体。

已有的研究显示羊膜腔封闭尽管能阻止羊水渗漏，但大多为机械性封闭作用，胎膜破口被封闭材料封闭后是否能够促进羊膜破口修复是更需要关注的问题。

体外构建的纤维蛋白支架块由纤维蛋白原，纤维结合素，Ⅷ因子复合物、Ⅹ Ⅲ因子，凝血酶，抑肽酶和钙组成，是一种天然高分子材料，来源于哺乳动物（牛）和人血清，它是模仿血凝级联反应的最后阶段，形成稳定的血凝块，可对抗空气或液体的通过；具有生物相容性，可吸收性、无毒性等特点，特别是能快速形成，维持时间长，纤维蛋白溶解缓慢。我们研究发现培养瓶中的血纤维蛋白块置入 CO_2 培养箱内，持续 20 天未见明显降解，提供了羊膜上皮细胞在纤维蛋白支架生长增殖的充足时间。

本实验通过在纤维蛋白支架上培养羊膜上皮细胞，观察其生长情况，发现纤维蛋白支架呈半透亮、半凝胶、有弹性的细网状结构，人羊膜上皮细胞能够在纤维蛋白支架表面生长，其生长良好，由于纤维蛋白支架具有一定强度，不但能够支持细胞的高密度生长，而且网状空隙为组织液的流通提供了通道，使羊膜上皮细胞能够得到足够的营养；细胞间有伪足等多种形式相接触，这更有利于组织的功能性修复，提示纤维蛋白支架是修复胎膜破口较好的组织学材料。

PPROM 发生与羊膜上皮细胞的凋亡有关，以

维普资讯 http://www.cqvip.com

前的研究认为羊膜 FasL 表达增加，诱导羊膜上皮细胞的凋亡，导致胎膜早破[3,4]。

细胞的凋亡与细胞生长因子有密切关系。羊膜上皮细胞为不稳定细胞，总在不断地增殖，以代替衰亡或破坏的细胞，这些细胞的更新过程中，有重要细胞生长因子如 EGF、bFGF、TGF-β 等的参与。

EGF 的体外作用是促细胞生长，作用于创伤修复的细胞有角化细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞。尚未有研究 EGF 对 HAEC 的影响。该实验加入 EGF 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数较对照组明显减少（$P<0.05$）。

bFGF 广泛存在于脑、肾、肾上腺、黄体等许多组织，几乎可刺激所有间叶细胞，但主要作用于内皮细胞，尤其在毛细血管的新生过程中，能使内皮细胞分裂并诱导其产生蛋白溶解酶，溶解基膜，便于内皮细胞穿越生芽。该实验加入 bFGF 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数也较对照组明显减少（$P<0.05$）。

TGF-β 对于不同的组织及细胞呈现不同的作用，即增殖或凋亡，该实验加入 TGF-β_1 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数较对照组明显增加（$P<0.05$）。

本实验提示：HAEC 能够在体外构建的纤维蛋白支架上良好生长，而添加 EGF 和 bFGF 可减少 HAEC 的凋亡，从而为临床上纤维蛋白支架联合细胞生长因子修复 PPROM 破口提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] 漆洪波，李 玮，孙江川，等.体外构建纤维蛋白支架封闭胎膜破口的研究 [J]. 中国实用妇科与产科杂志，2005；21(6)：377-378.

[2] 王一飞，戴 云，刘杰生，等.含重组碱性成纤维细胞生长因子培养基中 3T3 成纤维细胞在血纤维蛋白凝块上生长的可能性 [J]. 中国病理生理杂志，2000；16(2)：97-101.

[3] Polzin WJ,Brady K.The etiology of premature rupture of the membranes[J]. Clinical obstetrics and Gynecology，1998；4(41)：810-816.

[4] Lockwood CJ,Kuczynski E.Markers of risk for preterm delivery [J]. Perinat Med,1999；27(1)：5-20.

（上接第 207 页） 疗效观察、预后判断中起重要作用[3~5]。DQα 基因系人特有的基因，本研究植入 SCID 小鼠系人白血病细胞，因此我们选择人 DQα 基因、白血病细胞 ABL-BCR 基因检测指标作为判断白血病模型成功与否。我们采用 RT-PCR 检测人 DQα 基因、白血病细胞 ABL-BCR 基因，发现 K562 细胞 3～4w 即可浸润肝、脾、肾、骨髓等主要脏器。接种 K562 细胞的 SCID 小鼠，病理学检查发现在腹腔内形成实体肿瘤块，可见腹水，主要累及肾、结肠、睾丸、背部肌肉及脊柱，组织切片发现瘤块组织的免疫组织化学显示 CD_{13} 强表达，胞膜及胞浆中见棕褐色颗粒，在肝、脾、肺内有瘤细胞浸润，以脾脏更明显（CD_{13} 强表达）。以静脉或腹腔接种建立人白血病细胞（K562）SCID 小鼠模型，骨髓检查发现小鼠接种 K562 细胞后，骨髓中大量肿瘤细胞增生，CD_{13} 阳性率达 41%；脾脏 CD_{13} 阳性率达 38%。因而以 CD_{13} 阳性率判断肿瘤细胞浸润指标能快速、客观地判断病情，且进一步可将此指标作为评价化疗药、生物抗瘤剂的体内疗效参数。以上结果表明，我们建立的 SCID 小鼠白血病（K562）模型是成功的，可以进行下一步的药理学研究。

参 考 文 献

[1] 聂小蒙，楼敬伟，王建民. SCID 小鼠－人白血病模型在白血病研究中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志，2003；11(1)：99-104.

[2] 林祥华，陈志哲，林景娟，等. 人白血病细胞重度联合免疫缺陷小鼠模型的建立和监测[J]. 福建医科大学学报，2002；36(4)：352-355.

[3] Ohsugi T, Horie R, Kumasaka T, et al. In vivo antitumor activity of the NF- {kappa} B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell [J]. leukemia Carcinogenesis，2005;29(4):14-18.

[4] Ninomiya M, Kiyoi H, Ito M, et al. Retinoic acid syndrome in NOD/scid mice induced by injecting an acute promyelocytic leukemia cell line [J]. Leukemia, 2004;18(3):442-448.

[5] Tomkinson B, Bendele R, Giles FJ, et al. OSI-211, a novel liposomal topoisomerase I inhibitor, is active in SCID mouse models of human AML and ALL [J]. Leuk Res, 2003;27(11):1039-1050.