

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001995

## 雌二醇对人羊膜间充质干细胞增殖、凋亡的影响

毛艳华, 阳媛, 张应凤, 孙聪聪, 陈芯培, 王佳

(重庆医科大学附属大学城医院妇产科, 重庆 401331)

**【摘要】目的:**研究不同浓度雌二醇(estradiol,  $E_2$ )对人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stromal cells, HAMSCs)体外培养中增殖、凋亡的影响。**方法:**采用改良酶消化法提取 HAMSCs, 流式细胞学方法和免疫荧光法鉴定提取细胞。HAMSCs 培养方法分为对照组和  $E_2$  组(分别加入浓度为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ )。CCK-8 检测各组 HAMSCs 增殖情况; qRT-PCR 检测干细胞特异基因 *Oct-4* 和凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bax* 的表达; Western blot 检测凋亡相关蛋白 *Bcl-2*、*Bax* 的表达。**结果:**CCK-8 检测显示各浓度  $E_2$  组和对照组的 HAMSCs 增殖活性在 1~6 d 都随时间的变化而变化( $F_{\text{时间}}=2418.132$ ,  $P_{\text{时间}}=0.000$ ); 各浓度  $E_2$  组在 1~4 d 的增殖率与对照组无明显差异; 4 d 后, 各浓度  $E_2$  组的增殖率明显高于对照组( $F_{\text{组别}}=246.601$ ,  $P_{\text{组别}}=0.000$ ), 各浓度组间无明显差异。qRT-PCR 检测显示  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  组( $1.00 \pm 0.10$ )的 *Oct-4* mRNA 表达水平较对照组( $0.58 \pm 0.16$ )和其他  $E_2$  浓度组( $1.31 \pm 0.22$ 、 $0.81 \pm 0.04$ 、 $0.78 \pm 0.07$ )上调( $P=0.000$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ); 除  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  组( $0.83 \pm 0.47$ ,  $P=0.084$ )外, 其他  $E_2$  浓度组( $0.49 \pm 0.25$ 、 $0.38 \pm 0.19$ 、 $0.32 \pm 0.10$ )抗凋亡基因 *Bcl-2* 基因表达量均较对照组( $1.06 \pm 0.13$ )下调( $P=0.038$ ,  $P=0.015$ ,  $P=0.010$ )。  $10^{-5}$  mol/L  $E_2$  组( $2.20 \pm 0.58$ )的 *Bax* 基因较对照组、其他  $E_2$  浓度组( $1.00 \pm 0.05$ 、 $1.52 \pm 0.38$ 、 $1.38 \pm 0.17$ 、 $1.17 \pm 0.19$ )上调( $P=0.001$ ,  $P=0.028$ ,  $P=0.012$ ,  $P=0.003$ )。Western blot 检测提示  $10^{-5}$  mol/L  $E_2$  组( $0.514 \pm 0.014$ )的促凋亡蛋白表达 *Bax* 较对照组( $0.201 \pm 0.017$ )明显上调( $P=0.000$ ), 而抗凋亡蛋白 *Bcl-2*( $0.366 \pm 0.024$ )与对照组( $0.215 \pm 0.080$ )之间差异无统计学意义( $P=0.055$ )。而  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  组( $0.378 \pm 0.016$ )的促凋亡蛋白 *Bax* 较其他浓度  $E_2$  组( $0.514 \pm 0.014$ 、 $0.547 \pm 0.036$ 、 $0.577 \pm 0.028$ )表达降低( $P=0.000$ )。**结论:**  $E_2$  促进 HAMSCs 的增殖呈时间依赖性, 高浓度  $E_2$ ( $10^{-5}$  mol/L)促进 HAMSCs 凋亡, 较高浓度  $E_2$ ( $10^{-6}$  mol/L)维持 HAMSCs 活性并保护其分化潜能。

**【关键词】**间充质干细胞; 雌二醇; 增殖; 凋亡**【中图分类号】**R329.2\*6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-17

## Effects of estradiol on proliferation and apoptosis in human amniotic mesenchymal stromal cells

Mao Yanhua, Yang Yuan, Zhang Yingfeng, Sun Congcong, Chen Xinpei, Wang Jia

(Department of Obstetrics and Gynecology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To explore the effects of different concentrations of estradiol ( $E_2$ ) on proliferation and apoptosis in human amniotic mesenchymal stromal cells (HAMSCs). **Methods:** The improved enzyme digestion method was used to isolated culture HAMSCs. Flow cytometry analysis and immunofluorescence staining were used to identify the cultured cell. HAMSCs were divided into control group and  $E_2$  group ( $E_2$  with concentration of  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L were added respectively). The proliferative ability of HAMSCs in each group was measured by cell counting Kit-8 assay (CCK-8). Real-time PCR method was applied to measure the expression of the mRNA associated with pluripotency (*Oct-4*) and the expression of apoptosis-related genes *Bcl-2* and *Bax*. The expression of apoptosis-related protein *Bcl-2* and *Bax* was measured by Western blot. **Results:** CCK-8 showed that the proliferation activity of HAMSCs in each concentration  $E_2$  group and control group changed with time ( $F_{\text{time}}=2418.132$ ,  $P_{\text{time}}=0.000$ ). There was no significant difference between the the proliferation rate of the  $E_2$  group of each concentration in the 1 to 4 days and the control group, while the proliferation rate of each concentration  $E_2$  group was significantly higher than that of the control group after 4 days ( $F_{\text{group}}=246.601$ ,  $P_{\text{group}}=0.000$ ), and there was no significant difference among the concentration groups. Real-time PCR analysis showed that mRNA expression of *Oct-4* was significant higher in  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  group ( $1.00 \pm 0.10$ ) than in control group ( $0.58 \pm 0.16$ ) and other  $E_2$  concentration group ( $1.31 \pm 0.22$ ,  $0.81 \pm 0.04$ ,

作者介绍: 毛艳华, Email: 806992912@qq.com,

研究方向: 干细胞组织修复研究。

通信作者: 王佳, Email: 752203031@qq.com。

基金项目: 重庆市卫生计生委医学科研资助项目(编号: 20141014);

重庆市医疗特色专科建设资助项目(编号: 2013-46)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190222.0924.048.html>

(2019-02-22)

$0.78 \pm 0.07$ ) ( $P=0.000, P=0.020, P=0.001, P=0.001$ ). In addition to  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  group ( $0.83 \pm 0.47$ ) ( $P=0.084$ ), the expression of *Bcl-2* mRNA was significant lower in other  $E_2$  concentration group ( $0.49 \pm 0.25, 0.38 \pm 0.19, 0.32 \pm 0.10$ ) than in control group ( $1.06 \pm 0.13$ ) ( $P=0.038, P=0.015, P=0.010$ ), and mRNA expression of *Bcl-2* was significant higher in  $10^{-5}$  mol/L  $E_2$  group ( $2.20 \pm 0.58$ ) than in control group ( $1.00 \pm 0.05$ ) and other  $E_2$  concentration group ( $1.52 \pm 0.38, 1.38 \pm 0.17, 1.17 \pm 0.19$ ) ( $P=0.001, P=0.028, P=0.012, P=0.003$ ). Western blot showed that protein expression of Bax was significant higher in  $10^{-5}$  mol/L  $E_2$  ( $0.514 \pm 0.014$ ) group than control group ( $0.201 \pm 0.017$ ) ( $P=0.000$ ). Nevertheless, protein expression of *Bcl-2* was no significant higher in  $10^{-5}$  mol/L  $E_2$  group ( $0.366 \pm 0.024$ ) than in control group ( $0.215 \pm 0.080$ ) ( $P=0.055$ ). Protein expression of Bax was significant lower in  $10^{-6}$  mol/L  $E_2$  group ( $0.378 \pm 0.016$ ) than in other  $E_2$  concentration group ( $0.514 \pm 0.014, 0.547 \pm 0.036, 0.577 \pm 0.028$ ) ( $P=0.000$ ). **Conclusions:** The present study demonstrates  $E_2$  can promote the proliferation of HAMSCs, proliferative effect was time dependency. And high concentration of  $E_2$  group ( $10^{-5}$  mol/L) can promote apoptosis, however higher concentration of  $E_2$  group ( $10^{-6}$  mol/L) can maintain activity of HAMSCs and protect pluripotency.

**【Key words】**mesenchymal stromal cells; estradiol; proliferation; apoptosis

人羊膜间充质干细胞(human amnion mesenchymal stromal cells, HAMSCs)从羊膜中分离而来,研究证明其为多功能干细胞,具有多分化潜能,在体内外可分化成为多种细胞<sup>[1]</sup>。由于剖宫产后的人羊膜是废弃物,不涉及伦理道德问题,具有取材方便、低免疫原性等特点<sup>[2]</sup>,在再生医学研究领域越来越受到重视。HAMSCs 已应用于多种损伤修复的体内外研究中,在后肢缺血<sup>[3]</sup>、心肌梗死再灌注<sup>[4]</sup>、创伤愈合<sup>[5]</sup>、宫腔粘连子宫内膜修复<sup>[6]</sup>的研究中发现有明显的治疗作用。但 HAMSCs 在体外培养过程中,随传代次数增多而出现增殖趋缓、细胞退化现象等<sup>[7]</sup>,不利于对 HAMSCs 进一步的体外研究。如何保持 HAMSCs 的增殖能力,抑制 HAMSCs 的凋亡并能保护其多分化潜能,是进行 HAMSCs 深入研究和将来进行细胞治疗的关键。雌激素影响哺乳动物的许多生理过程,包括细胞增殖、凋亡及分化<sup>[8-9]</sup>,而 HAMSCs 来自分娩后的胎盘羊膜,胎盘合成雌激素,羊水中含大量激素,羊膜上有与羊水进行交换的微绒毛<sup>[10]</sup>。所以本实验旨在研究雌二醇(estradiol,  $E_2$ )对 HAMSCs 在增殖、凋亡及分化潜能中的影响,提高 HAMSCs 在体外培养过程中的活性及分化潜能,为深入研究 HAMSCs 在再生医学领域中的应用提供更优质的细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本 实验所收集胎盘均来自重庆医科大学附属第一医院产科足月产剖宫产,产妇无其他基础疾病,术前

均签署知情同意书,通过重庆医科大学伦理委员会审查。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基(Corning, USA),胎牛血清(PAN-seratech, Gmbh), CD29-FITC、CD45-PE、CD90-FITC 流式细胞学抗体(ebioscience, USA),  $\beta$ -雌二醇(Sigma, USA), 抗小鼠波形蛋白抗体(Vimentin)、抗小鼠角蛋白抗体(cytokeratin18, CK18, Santa Cruz, USA), 山羊抗小鼠 IgG 免疫荧光二抗(abbkine, USA), DAPI 荧光染料(碧云天), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 二抗(联科生物), ECL 荧光底物(Millipore, Billerica, USA), 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(上海同仁), RNA 引物合成、trizol (Takara, 中国大连), 逆转录试剂盒(Biotool, USA), sybr (Biomake, USA), RIPA、PSMF、蛋白定量试剂盒(碧云天)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞分离 在无菌条件下剥离胎盘胎面羊膜,杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate-buffered saline, D-PBS)反复冲洗至羊膜呈透明白色,将羊膜尽量剪成碎,加入0.05%胰蛋白酶消化2次,每次均30 min。10%含血清DMEM/F12终止消化后,加入1 g/L I型胶原酶,于37 °C中震荡消化1 h, 200目滤网过滤,收集细胞滤液,接种于50 cm<sup>2</sup>塑料培养瓶,用含体积分数为10%胎牛血清、青霉素 $1 \times 10^5$  U/L、链霉素 $1 \times 10^5$  U/L的DMEM/F12培养基,置于37 °C、体积分数5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱培养。每3 d更换1次培养基,倒置相差显微镜观察细胞形态变化。

1.2.2 细胞传代培养 倒置相差显微镜观察 HAMSCs 融合率达到80%左右,加入0.25%胰酶置于37 °C消化1 min,使贴壁细胞脱落、变圆,然后加入等体积含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化,以1 200 r/min的转速离心5 min,弃上清液,取10  $\mu$ L重悬滴进细胞计数板,在显微镜下进行细胞计数,细胞数/mL=(4个大格的总数/4)  $\times 10^4$ ,最后以 $1 \times 10^5$ 个/mL细胞浓度种于50 cm<sup>2</sup>培养瓶中,人羊膜间充质干细胞传至第3代细胞分组进行试验。

1.2.3 流式细胞学鉴定第 3 代 HAMSCs 表面标志物 弃去培养液,消化细胞,PBS 洗 2 遍后,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL,装入 EP 管中,每管加入 100  $\mu$ L 细胞悬液,室温下避光分别加入鼠抗人单克隆抗体 CD29-FITC、CD90-FITC、CD45-PE,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min,每个 EP 管中均加入 500  $\mu$ L PBS,充分震荡,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞后行流式细胞仪鉴定,计算细胞表面抗原阳性率。

1.2.4 免疫荧光鉴定 HAMSCs 特异性蛋白表达 将 HAMSCs 消化、重悬后,以  $0.8 \times 10^4$  个/孔的细胞数种到 96 孔板。24 h 后,细胞贴壁,PBS 洗 2 次,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次,用 0.25% Triton、37  $^{\circ}$ C、10 min 破细胞膜,PBS 洗 3 次,5% BSA、37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min。分别加入一抗(抗小鼠波形蛋白,抗小鼠角蛋白),各重复 3 孔。4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,分别加入相应的二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,避光 PBS 洗 3 次,加 DAPI 孵育 5~8 min,PBS 洗 3 次后,加抗荧光淬灭剂。用荧光显微镜进行拍照,观察细胞特异性蛋白的表达情况。

1.2.5 不同浓度  $E_2$  处理 HAMSCs 将 HAMSCs 传代培养至第 3 代后,培养方法分为对照组和  $E_2$  组(分别加入浓度为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ )。隔天换液 1 次,培养 7 d。

1.2.6 不同浓度  $E_2$  下 HAMSCs 的生长曲线 将第 3 代 HAMSCs 消化、重悬后,以  $0.3 \times 10^4$  个/孔的细胞数种到 96 孔板。24 h 细胞贴壁后更换对照组和  $E_2$  组(分别加入浓度为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ ) 培养基,分别在种板后第 1、2、3、4、5、6 天的同一时间加 CCK-8 溶液(100  $\mu$ L 培养基+10  $\mu$ L CCK-8 溶液/孔),每次设置 1 组空白组(仅含培养基+CCK-8 溶液),37  $^{\circ}$ C 培养 2 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔的吸光度(absorbance, A) 值,绘制生长曲线图。

1.2.7 qRT-PCR 检测干细胞特异基因 *Oct-4*、凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 的表达 提取各组细胞 7 d 后的 RNA,PBS 洗 3 遍,使用 trizol 试剂裂解 RNA,反转录获得 cDNA,进行 qRT-PCR 反应。按照引物序列及 PCR 试剂盒说明书完成 PCR 反应体系; $\beta$ -actin 作为内参,通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法,对各组基因表达量进行统计。引物在 NCBI 基因数据库中比对无误,由 Takara 公司合成(表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物相应序列

引物名称	产物长度	引物序列
$\beta$ -actin	132	上游 5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3' 下游 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCTCTGT-3'
<i>Oct-4</i> ( <i>POU5F1</i> )	96	上游 5'-GAGAAGGATGCTGCTCCGACTGT-3' 下游 5'-AGCAGCCTCAAAATCCTCTCG-3'
<i>Bcl-2</i>	170	上游 5'-CATGTGTGTGAGAGCGTCA-3' 下游 5'-AGAAATCAAACAGAGCCCGCA-3'
<i>Bax</i>	214	上游 5'-TGACGGCACTTCAACTGGG-3' 下游 5'-CAGGGACATCAGTCGCTTCACT-3'

1.2.8 Western blot 检测 *Bcl-2*、*Bax* 蛋白的表达量 提取各组细胞处理 7 d 后的蛋白,每  $10^6$  个细胞加入 200  $\mu$ L 细胞裂

解液,裂解细胞提取总蛋白,蛋白浓度定量试剂盒测定蛋白浓度,取等量蛋白样品(40  $\mu$ g)进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后将蛋白转移至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入抗鼠 *bcl-2* 抗体(1:1 000 稀释)、抗鼠 *bax* 抗体(1:500 稀释)和  $\beta$ -actin 抗体(1:1 000 稀释),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,加入 HRP 标记二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,ECL 荧光底物显色,暗室中用高敏感 X 线胶片曝光显影。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件分析数据。实验数据以均数  $\pm$  标准差表示( $\bar{x} \pm s$ ),两组计量资料比较采用两独立样本 *t* 检验统计分析,多组计量资料比较采用单因素方差统计分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 HAMSCs 的生长特性及鉴定

倒置相差显微镜下观察显示:原代细胞刚接种 24 h 后,细胞开始贴壁,呈短小梭形或原形(图 1A)。培养 72 h 后,细胞呈纺锤形或梭形,可见散在分布的细胞集落形成(图 1B)。6~7 d,细胞生长可达 80%~90% 融合,平行排列呈漩涡状或辐射状,细胞形态以梭形为主。细胞传代后 24 h 贴壁,呈长梭形,3 代后形态趋于一致,不见圆形细胞,细胞呈成纤维细胞样生长(图 1C)。流式细胞学检测第 3 代 HAMSCs,结果显示细胞表面标记 CD29、CD90 表达率分别为  $(98.17 \pm 0.76)\%$ 、 $(98.83 \pm 0.68)\%$ ;造血干细胞表面标记 CD45 表达率为  $(0.05 \pm 0.49)\%$ (图 1D);免疫荧光法检测第 3 代 HAMSCs 角蛋白、波形蛋白表达情况,结果显示波形蛋白表达阳性,角蛋白表达阴性(图 2)。

### 2.2 不同浓度 $E_2$ 对 HAMSCs 增殖影响

免疫荧光法检测到第 3 代 HAMSCs 雌激素受体(ER)表达阳性(图 3A)。CCK-8 试剂检测不同浓度  $E_2$  作用下第 3 代 HAMSCs 的增殖情况,绘制的生长曲线(图 3B)。各浓度  $E_2$  组和对照组的 HAMSCs 增殖活性在 1~6 d 都随时间的变化而变化( $F_{\text{时间}}=2\ 418.132, P_{\text{时间}}=0.000$ );各浓度  $E_2$  组在 1~4 d 的增殖率与对照组无明显差异;4 d 后,同一时间点各浓度  $E_2$  组的增殖率明显高于对照组,各浓度组间无明显差异,第 5 天时,各  $E_2$  浓度组( $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ )分别与对照组相比,细胞增殖活性分别增加 48.84% ( $P=0.001$ )、34.88% ( $P=0.001$ )、62.79% ( $P=0.000$ )、65.12% ( $P=0.003$ );第 6 天时,各  $E_2$  浓度组( $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ )分别与对照组相比,细胞增殖活性分别增加 40.00% ( $P=0.000$ )、101.81% ( $P=0.012$ )、107.27% ( $P=0.000$ )、116.36% ( $P=0.005$ ),提示  $E_2$  促进 HAMSCs 生长呈时间依赖性,在第 1~4 天作用不显著,第 4 天后促增殖作用显著,各浓度组间无明显差异。见表 2。

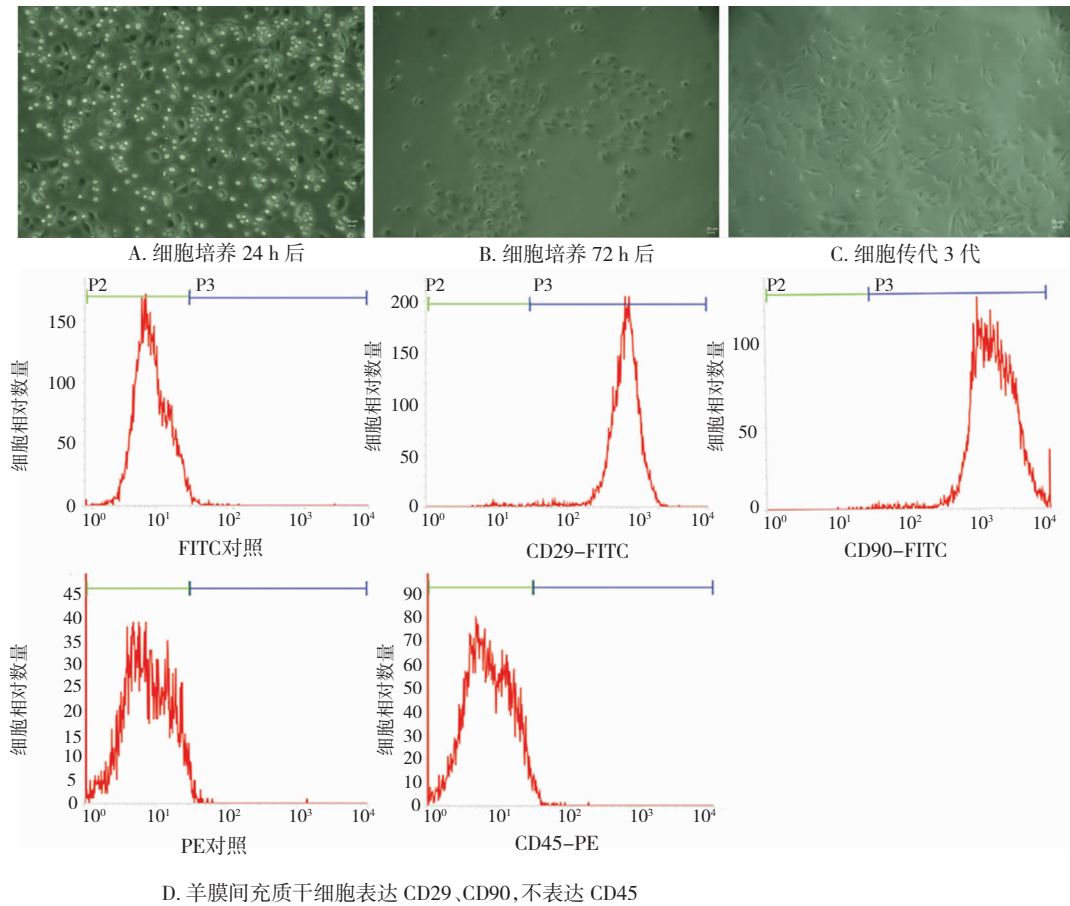
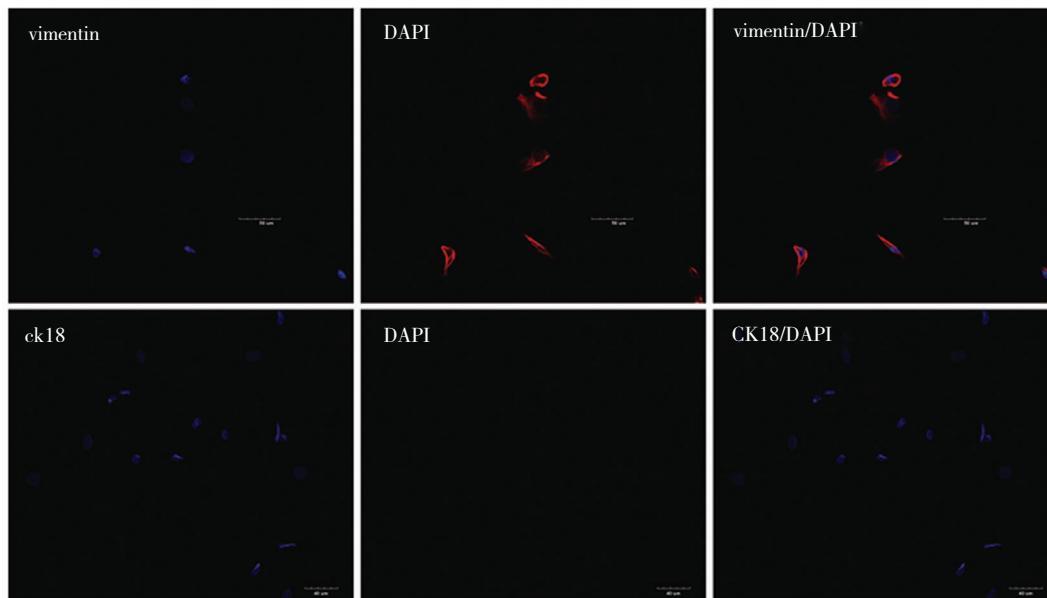


图 1 羊膜间充质干细胞原代培养及表面标记物鉴定



第 3 代羊膜间充质干细胞 Vimentin 表达阳性, CK18 表达阴性

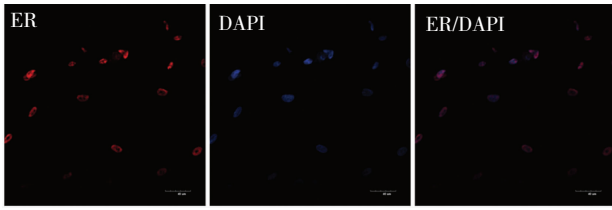
图 2 免疫荧光方法检测羊膜间充质干细胞 Vimentin、CK18 表达情况

### 2.3 qRT-PCR 检测 *Oct-4*、*Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达

含 2% 血清浓度的 DMEM/F12 培养基分别加入浓度为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L  $E_2$ , 培养 7 d 后, 提取的 RNA, 经实

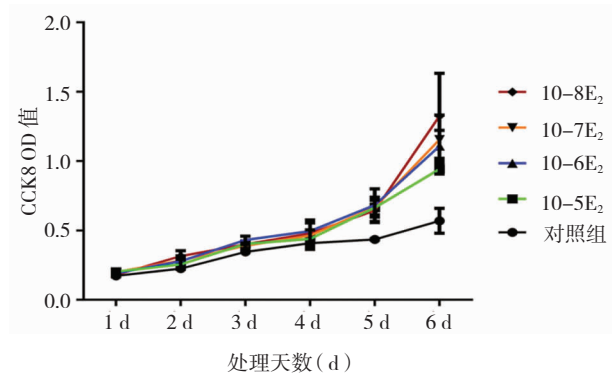
时 qRT-PCR 扩增, 检测各组干细胞相关基因 *Oct-4*、抗凋亡基因 *Bcl-2*、促凋亡基因 *Bax* 的表达情况, 结果见表 3。较高浓度  $E_2$  ( $10^{-6}$  mol/L) *Oct-4* 基因表达量较对照组、其他  $E_2$  浓度





ER 抗体为红色;DAPI 染细胞核为蓝色;ER/DAPI 为 ER 抗体与 DAPI 的合成图

A. 免疫荧光检测羊膜间充质干细胞雌激素受体 ( ER ) 表达阳性



根据 CCK-8 法测得  $A_{450\text{nm}}$  值,绘制不同浓度雌激素作用下羊膜间充质干细胞增殖曲线

B. 细胞增殖曲线

图 3 雌激素促进羊膜间充质干细胞增殖

表 2 CCK-8 细胞增殖试验各组平均  $A_{450\text{nm}}$  值 (  $n=4, \bar{x} \pm s$  )

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
对照组	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.55 ± 0.01
10 <sup>-5</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.77 ± 0.01
10 <sup>-6</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.19 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.58 ± 0.01	1.11 ± 0.09
10 <sup>-7</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.20 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.70 ± 0.08	1.14 ± 0.01
10 <sup>-8</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.18 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.71 ± 0.03	1.19 ± 0.08

注:  $F_{\text{组别}}=246.601, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=2\ 418.132, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=77.834, P_{\text{交互}}=0.000; 1\sim 4\text{ d}$  同一时间点不同组之间统计学比较,  $P>0.05; 5\text{ d}$  时 B 与 A 比较  $P=0.001, C$  与 A 比较  $P=0.001, D$  与 A 比较  $P=0.000, E$  与 A 比较  $P=0.003; 6\text{ d}$  时 B 与 A 比较  $P=0.000, C$  与 A 比较  $P=0.012, D$  与 A 比较  $P=0.000, E$  与 A 比较  $P=0.005$

表 3 各组中 *Oct-4*、*Bcl-2*、*Bax* 的 mRNA 表达水平 (  $n=3, \bar{x} \pm s$  )

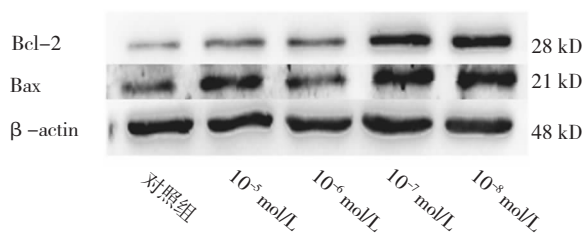
组别	<i>Oct-4</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>
对照组	0.58 ± 0.16	1.06 ± 0.13	1.00 ± 0.05
10 <sup>-5</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	1.00 ± 0.10	0.49 ± 0.25	2.20 ± 0.58
10 <sup>-6</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	1.31 ± 0.22 <sup>abcd</sup>	0.83 ± 0.47 <sup>gh</sup>	1.52 ± 0.38 <sup>ikl</sup>
10 <sup>-7</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.81 ± 0.04	0.38 ± 0.19	1.38 ± 0.17
10 <sup>-8</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.78 ± 0.07	0.32 ± 0.10	1.17 ± 0.19
F 值	12.600	3.827	5.918
P 值	0.001	0.039	0.010

注: a, 与对照组比较,  $P=0.000; b$ : 与 10<sup>-5</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.020; c$ : 与 10<sup>-7</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.001; d$ : 与 10<sup>-8</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.001; e$ : 与对照组比较,  $P=0.436; f$ : 与 10<sup>-5</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.038; g$ : 与 10<sup>-7</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.015; h$ : 与 10<sup>-8</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.010; i$ : 对照组比较,  $P=0.001; j$ : 与 10<sup>-6</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.028; k$ : 与 10<sup>-7</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.012; l$ : 与 10<sup>-8</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较,  $P=0.003$

组 (10<sup>-5</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L) 上调 ( $P=0.000, P=0.020, P=0.001, P=0.001$ ); 较高浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> mol/L) 抗凋亡基因 *Bcl-2* 基因表达量较对照组差异无统计学意义 ( $P=0.436$ ), 其他 E<sub>2</sub> 浓度组 (10<sup>-5</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L) 抗凋亡基因 *Bcl-2* 基因表达量均较对照组下调 ( $P=0.038, P=0.015, P=0.010$ )。高浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> mol/L) 促凋亡基因 *Bax* 基因表达量较对照组、其他 E<sub>2</sub> 浓度组 (10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L) 上调 ( $P=0.001, P=0.028, P=0.012, P=0.003$ )。提示较高浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> mol/L) 上调干细胞特异基因 *Oct-4* 表达, 维持抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达水平, 其余浓度组下调抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达水平; 而高浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> mol/L) 上调促凋亡基因 *Bax* 表达。

2.4 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达量

高浓度的 E<sub>2</sub> 促进 HAMSCs 促凋亡蛋白 Bax 表达增加: 含 2% 血清浓度的 DMEM/F12 培养基分别加入浓度为 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L E<sub>2</sub>, 培养 7 d 后, 提取的总蛋白, 采用 Western blot 检测各组抗凋亡蛋白 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 表达情况, 结果如图 4、表 4 所示: 高浓度 E<sub>2</sub> 组 (10<sup>-5</sup> mol/L) 的促凋亡蛋白 Bax 蛋白量明显高于对照组 ( $P=0.000$ ), 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 并未同时升高, 与对照组之间差异无统计学意义 ( $P=0.055$ )。较高浓度 E<sub>2</sub> 组 (10<sup>-6</sup> mol/L) 的促凋亡蛋白 Bax 较其他浓度 E<sub>2</sub> 组 (10<sup>-5</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L) 表达降低 ( $P=0.000$ )。近生理浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L) 的抗凋亡蛋白 Bcl-2 同促凋亡蛋白 Bax 表达量都明显高于对照组、较高浓度 E<sub>2</sub> 组 (10<sup>-6</sup> mol/L) ( $P=0.000$ )。



Bcl-2为抗凋亡蛋白,分子量 28 kD;Bax 为促凋亡蛋白,分子量 21 kD;  $\beta$ -actin 作为内参蛋白,分子量 48 kD

图 4 羊膜间充质干细胞不同浓度 E<sub>2</sub> 作用下  
凋亡相关蛋白表达情况

表 4 各组中 Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平 (  $n=3, \bar{x} \pm s$  )

组别	Bcl-2	Bax
对照组	0.215 ± 0.080	0.201 ± 0.017
10 <sup>-5</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.366 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.514 ± 0.014 <sup>cd</sup>
10 <sup>-6</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.400 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.378 ± 0.016 <sup>c</sup>
10 <sup>-7</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	0.887 ± 0.054 <sup>c</sup>	0.547 ± 0.036 <sup>cd</sup>
10 <sup>-8</sup> mol/L E <sub>2</sub> 组	1.078 ± 0.161 <sup>c</sup>	0.577 ± 0.028 <sup>cd</sup>
F 值	57.038	130.845
P 值	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P=0.055$ ;b:与对照组比较, $P=0.024$ ;c:与对照组比较, $P=0.000$ ;d:与 10<sup>-6</sup> mol/L E<sub>2</sub> 组比较, $P=0.000$

### 3 讨论

临床试验中发现羊膜移植对治疗宫腔粘连具有很好的疗效<sup>[1]</sup>,但具体机制尚不明确。有研究发现 HAMSCs 在大鼠的宫腔粘连模型中,通过免疫调节作用促进子宫内膜再生<sup>[6]</sup>。为进一步研究 HAMSCs 在治疗宫腔粘连中的具体机制,优化宫腔粘连治疗方案,减少宫腔粘连复发率,准备对 HAMSCs 特性和分化能力进行深入的研究。在对 HAMSCs 提取和培养中发现,虽然获取 HAMSCs 的分离方法已有报道<sup>[12]</sup>,并有报道称 HAMSCs 可在体外培养中传代至 20 代以上<sup>[13]</sup>,但不同的分离方法所获取的 HAMSCs 在细胞量、细胞形态等存在差异。并且, HAMSCs 在体外培养过程中会随着传代次数的增加,细胞形态、增殖能力、再分化能力等都会有所改变。本实验采取的是改良后的酶消化法分离提取羊膜细胞,并通过传代方法纯化 HAMSCs,羊膜上皮细胞在传代过程中去除,在传至第 3 代时 HAMSCs 形态基本为成纤维细胞样细胞,采用流式细胞学及免疫荧光鉴

定第 3 代 HAMSCs,鉴定结果符合 Parolini 等<sup>[14]</sup>报道的标准:细胞贴壁生长;细胞形态呈成纤维细胞样;表达细胞特异性表面抗原;具有多分化潜能;来源于羊膜。

有报道指出 E<sub>2</sub> 在骨髓间充质细胞的增殖、成骨分化方面起重要作用<sup>[15-16]</sup>。但也有报道 HAMSCs 在 E<sub>2</sub> 作用下出现老化,自噬体增多,线粒体出现代偿性增加,致细胞骨架和超微结构发生改变,从而可能影响其功能<sup>[17]</sup>。本实验旨在研究 E<sub>2</sub> 对 HAMSCs 在增殖、凋亡方面的影响,进一步探讨 HAMSCs 体外培养和诱导分化的优化方案。根据文献报道<sup>[18]</sup>E<sub>2</sub> 水平在孕期上升 100 倍(达 5.51 × 10<sup>8</sup> mol/L),故在第 3 代 HAMSCs 培养基中添加 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L 的 E<sub>2</sub> 浓度,检测细胞增殖、凋亡的变化。Cha 等<sup>[19]</sup>曾报道 E<sub>2</sub> 可能是通过调节细胞核上 ER $\alpha$  增强端粒酶活性,从而促进间充质干细胞增殖。本研究中也发现在 HAMSCs 的 ER $\alpha$  主要分布在细胞核,同时 CCK-8 细胞增殖实验结果表明,添加 E<sub>2</sub> 组与对照组相比在 1~4 d 内对细胞生长无明显作用,4 d 后开始明显促进细胞生长。可能是由于 HAMSCs 的增殖在第 4 天减缓,体外增殖能力减弱,而 E<sub>2</sub> 通过调节端粒酶活性维持细胞的体外增殖能力,促进细胞生长。不同浓度的 E<sub>2</sub> 对维持细胞的分裂增殖能力无显著差异,所以 E<sub>2</sub> 对维持细胞的分裂增殖能力呈时间依赖性而不呈浓度依赖性。

通过流式细胞学方法检测高浓度 E<sub>2</sub> 对 HAMSCs 凋亡的影响。发现 E<sub>2</sub> 浓度为 10<sup>-5</sup> mol/L 时促进细胞凋亡,而浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L 时抑制细胞凋亡。为进一步探索其作用机制,通过 qRT-PCR 和 Western bolt 检测不同浓度 E<sub>2</sub> 对凋亡相关基因、蛋白的影响,发现 E<sub>2</sub> 浓度为 10<sup>-5</sup> mol/L 时下调抗凋亡基因(*Bcl-2*),而促凋亡基因(*Bax*)上调。在蛋白表达水平上,E<sub>2</sub> 浓度为 10<sup>-5</sup> mol/L 时上调促凋亡蛋白(*Bax*),说明高浓度 E<sub>2</sub> 对 HAMSCs 起促凋亡作用。E<sub>2</sub> 浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L 时对抗凋亡基因(*Bcl-2*)无显著影响,而其他浓度(10<sup>-5</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L)都下调抗凋亡基因(*Bcl-2*),从蛋白水平也可看出 E<sub>2</sub> 浓度在 10<sup>-6</sup> mol/L 时对凋亡蛋白的影响最小,这可能是 E<sub>2</sub> 在此浓度时对维持 HAMSCs 的活性起一定作用。本实验中发现不同浓度 E<sub>2</sub> 对 Bcl-2 家族的基因和蛋白有不同影响,Ayaloglu-Butun 等<sup>[20]</sup>曾报道一定浓度的 E<sub>2</sub> 能

够减少骨髓间充质干细胞凋亡,其机制与 Bcl-2 家族有关,以上结果表明 E<sub>2</sub> 对 HAMSCs 在增殖、凋亡上的作用机制与对骨髓间充质干细胞相似,进一步说明 2 种细胞在功能机制方面具有相似性,而羊膜间充质干细胞因来源于胎盘废弃物、获取方法对人体无侵袭性操作,有望成为骨髓间充质干细胞在再生医学研究和治疗中的替代细胞。

本研究中还发现 E<sub>2</sub> 能够保护 HAMSCs 的多分化潜能,高浓度 (10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> mol/L) 的 E<sub>2</sub> 上调干细胞相关基因 *Oct-4* 的表达,而 10<sup>-6</sup> mol/L 的 E<sub>2</sub> 浓度作用最为显著 ( $P=0.000$ )。干细胞相关基因 *Oct-4* 在干细胞多能性遗传和表观遗传调控中起重要作用<sup>[21]</sup>。

综上所述,E<sub>2</sub> 对 HAMSCs 的增殖、凋亡及分化潜能都有一定影响,对细胞的增殖作用呈时间依赖性,而对细胞凋亡主要呈浓度依赖性。高浓度 E<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> mol/L) 促进 HAMSCs 凋亡,而 E<sub>2</sub> 浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L 时对 HAMSCs 的抗凋亡和维持干细胞多分化潜能的作用最为明显,筛选适宜浓度的 E<sub>2</sub> 有助于提高 HAMSCs 在体外培养过程中的活性及分化潜能,有望应用于 HAMSCs 的体内外研究中,并且对研究羊膜移植联合 E<sub>2</sub> 治疗宫腔粘连时 E<sub>2</sub> 剂量的选择提供参考,但与羊膜移植联合治疗的 E<sub>2</sub> 剂量,还需考虑 E<sub>2</sub> 对子宫内膜的影响等,其最适剂量还需进一步临床试验来验证。

## 参 考 文 献

- [1] Saito S, Lin YC, Murayama Y, et al. Human amnion-derived cells as a reliable source of stem cells[J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10): 1340-1349.
- [2] Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine[J]. *Differentiation*, 2011, 81(3): 162-167.
- [3] Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(3): 525-534.
- [4] Timmers L, Lim SK, Hofer IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res*, 2011, 6(3): 206-214.
- [5] Liu X, Wang Z, Wang R, et al. Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived, from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast, responses to cutaneous wounds[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2): 407-415.
- [6] Gan L, Duan H, Xu Q, et al. Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(5): 603-616.
- [7] 方宁, 张路, 宋秀军, 等. 人羊膜间充质干细胞的分离、培养及鉴定[J]. *遵义医学院学报*, 2009, 32(3): 234-236.
- [8] Celojovic D, Petersen A, Karlsson JO, et al. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1987-1996.
- [9] Xu J, Hu FF, Cui YG, et al. Effect of estradiol on proliferation and differentiation of side population stem/progenitor cells from murine endometrium[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9(1): 103.
- [10] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 32-36.
- [11] 蔡艾杞, 吴本媛, 王佳. 新鲜羊膜移植对中、重度宫腔粘连月经模式的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(4): 24-428.
- [12] 张惠娟, 丛 娜, 梁美萍, 等. 人羊膜间充质干细胞分离培养: 胰蛋白酶及胶原酶消化时间及浓度的选择[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6): 944-949.
- [13] 朴正福, 丁淑芹, 张海燕, 等. 人羊膜间充质干细胞的分离及分化潜能的研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2010, 14(1): 15-19.
- [14] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta; outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 300-311.
- [15] Yun SP, Lee MY, Ryu JM, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17 $\beta$ -estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(2): C317-326.
- [16] 刘德宝, 张复文, 任振华. 雌激素受体  $\alpha$  介导小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(3): 228-233.
- [17] 赵叶琳, 赵晓寅, 孙凌云, 等. 雌激素对人脐带来源间充质细胞骨架和超微结构的影响[J]. *中国医药生物技术*, 2011, 6(3): 198-203.
- [18] Hendrick V, Altshuler LL, Suri R. Hormonal changes in the postpartum and implications for postpartum depression[J]. *Psychosomatics*, 1998, 39(2): 93-101.
- [19] Cha Y, Kwon SJ, Seol W, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the effects of estradiol on telomerase activity in human mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cells*, 2008, 26(5): 454-458.
- [20] Ayaloglu-Butun F, Terzioglu-Kara E, Tokcaer-Keskin Z, et al. The effect of estrogen on bone marrow-derived rat mesenchymal stem cell maintenance; inhibiting apoptosis through the expression of Bcl-xL and Bcl-2[J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(2): 393-401.
- [21] Ding J, Xu H, Faiola F, et al. Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network[J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 155-167.

(责任编辑: 冉明会)