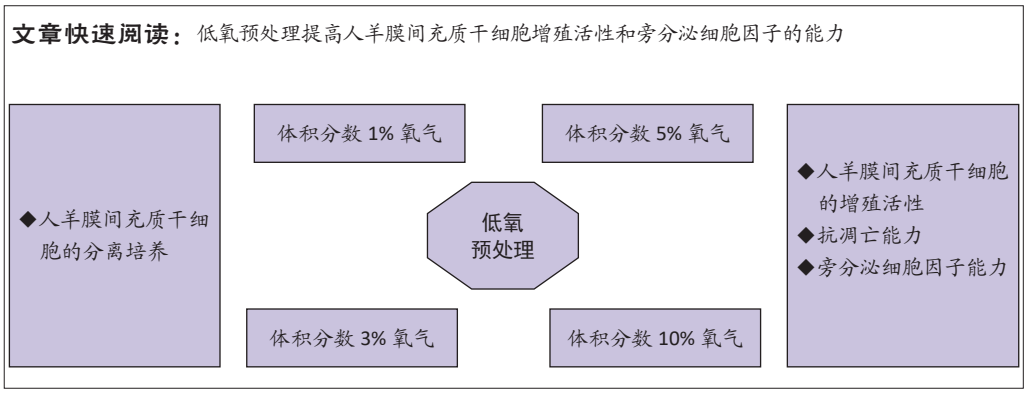
不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞的生物学特性

唐建宏[1]，张霓霓[2]，黄桂林[2]，龙元铸[2]，崔田宁[1]，骆勤亮[1]，郎家婵[1]，代 敏[2]，张立刚[2]

https://doi.org/10.12307/2023.392
投稿日期：2022-05-20
采用日期：2022-07-14
修回日期：2022-08-10
在线日期：2022-08-25
中图分类号：
R459.9；R394.2；R542.2
文章编号：
2095-4344(2023)15-02318-07
文献标识码：B



文题释义：

人羊膜间充质干细胞：来源于胎盘羊膜组织的一层半透明膜，是孕妇分娩后丢弃的废弃物，具有来源广、容易获取、免疫原性低、增殖能力强以及不受伦理道德限制等优势，广泛运用于治疗许多疾病，是组织工程研究领域理想的种子细胞来源。

低氧预处理：体外将间充质干细胞进行适当低氧预处理可增加间充质干细胞的增殖活性、抗凋亡能力以及旁分泌作用，将低氧预处理的间充质干细胞移植至体内可抵抗缺血缺氧微环境的改变。

摘要

背景：近年来，干细胞在组织损伤修复中发挥着重要作用，其中间充质干细胞移植应用最为广泛，间充质干细胞可以通过旁分泌细胞因子促进损伤组织的修复，低氧预处理可以改善间充质干细胞的生物学特性，因而，低氧预处理的人羊膜间充质干细胞可能在组织损伤修复中起到更好的治疗作用。

目的：探讨不同体积分数氧气预处理对人羊膜间充质干细胞增殖、抗凋亡能力、旁分泌作用的影响。

方法：利用酶消化法获得原代人羊膜间充质干细胞，将第3代人羊膜间充质干细胞通过不同体积分数氧气进行预处理48 h，随机分为1%，3%，5%，10%低氧预处理组和常氧对照组(体积分数21%氧气，倒置显微镜下观察人羊膜间充质干细胞的形态，CCK-8检测人羊膜间充质干细胞的增殖能力，Annexin V-FITC/PI试剂盒检测人羊膜间充质干细胞的凋亡情况，实时定量PCR法检测人羊膜间充质干细胞凋亡基因和缺氧诱导因子的表达，酶联免疫吸附法检测人羊膜间充质干细胞分泌的细胞因子水平。

结果与结论：显微镜下观察不同体积分数氧气预处理组人羊膜间充质干细胞的形态无明显差异，低氧预处理能提高人羊膜间充质干细胞的增殖、抗凋亡和旁分泌细胞因子的能力，且体积分数1%氧气预处理效果优于体积分数3%，5%，10%，21%氧气预处理。

关键词：人羊膜间充质干细胞；低氧；预处理；生物学特征

Biological characteristics of human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different volume fractions of oxygen

Tang Jianhong[1], Zhang Nini[2], Huang Guilin[2], Long Yuanzhu[2], Cui Tianning[1], Luo Qinliang[1], Lang Jiachan[1], Dai Min[2], Zhang Ligang[2]

[1]Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; [2]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Tang Jianhong, Master, Physician, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Zhang Nini, Master, Associate professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: In recent years, stem cell plays an important role in the repair of tissue injury, among which mesenchymal stem cell transplantation is the most widely used. Mesenchymal stem cells can secrete cytokines through paracrine effect to promote the repair of damaged tissue. Hypoxia pretreatment can improve the biological characteristics of mesenchymal stem cells. Hypoxic preconditioning of human amniotic mesenchymal stem cells may play a better therapeutic role in tissue injury repair.

[1] 遵义医科大学，贵州省遵义市 563000；[2] 遵义医科大学附属口腔医院口腔颌面外科，贵州省遵义市 563000

第一作者：唐建宏，女，1995 年生，贵州省桐梓县人，汉族，2022 年遵义医科大学毕业，硕士，医师，主要从事放射性涎腺损伤修复的研究。

通讯作者：张霓霓，硕士，副教授，遵义医科大学附属口腔医院口腔颌面外科，贵州省遵义市 563000

https://orcid.org/0000-0002-2424-4136 (唐建宏)

基金资助：国家自然科学基金 (81860198)，项目负责人：张霓霓；国家自然科学基金 (81960204)，项目负责人：黄桂林；遵义医科大学硕士启动基金 (KY2019-1)，项目负责人：代敏；贵州省卫健委基金 (gzwjkj2020-1-165)，项目负责人：张立刚；遵义医科大学“未来临床名医”项目 (20211017)，项目负责人：张霓霓

引用本文：唐建宏，张霓霓，黄桂林，龙元铸，崔田宁，骆勤亮，郎家婵，代敏，张立刚 . 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞的生物学特性 [J]. 中国组织工程研究，2023，27(15):2318-2324.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

OBJECTIVE: To study the effects of different hypoxic pretreatment on the proliferation, antiapoptotic ability, and parocrine effect of human amniotic mesenchymal stem cells.
METHODS: The primary human amniotic mesenchymal stem cells were obtained by enzyme digestion method. Passage 3 human amniotic mesenchymal stem cells were pretreated with different hypoxic concentrations for 48 hours and randomly divided into hypoxic pretreatment group (1% O_2, 3% O_2, 5% O_2, and 10% O_2) and control group (21% O_2). The morphology of human amniotic mesenchymal stem cells was observed under an inverted microscope. The proliferation ability of human amniotic mesenchymal stem cells was detected by CCK-8 assay. Annexin V-FITC/PI kit was used to detect the apoptosis of human amniotic mesenchymal stem cells. The apoptosis gene and hypoxia-inducible factor of human amniotic mesenchymal stem cells were detected by real-time quantitative PCR. The cytokine secretion capacity of human amniotic mesenchymal stem cells in each group was detected by enzyme-linked immunosorbent assay.
RESULTS AND CONCLUSION: Under the microscope, the morphology of human amniotic mesenchymal stem cells in different hypoxic pretreatment groups showed no significant difference. Hypoxic pretreatment could enhance the proliferation, anti-apoptotic and paracrine cytokine capacity of human amniotic mesenchymal stem cells. Pretreatment effect of 1% O_2 concentration was better than that of 3% O_2, 5% O_2, 10% O_2 and 21% O_2.
Key words: human amniotic mesenchymal stem cell; hypoxia; pretreatment; biological characteristics

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 81860198 (to ZNN); National Natural Science Foundation of China, No. 81960204 (to HGL); Master's Start-up Fund of Zunyi Medical University, No. KY2019-1 (to DM); a grant from Guizhou Provincial Health Commission, No. gzwjkj2020-1-165 (to ZLG); "Future Clinical Famous Doctor" Project of Zunyi Medical University, No. 20211017 (to ZNN)*
How to cite this article: *TANG JH, ZHANG NN, HUANG GL, LONG YZ, CUI TN, LUO QL, LANG JC, DAI M, ZHANG LG. Biological characteristics of human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different volume fractions of oxygen. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(15):2318-2324.*

0 引言 Introduction

唾液腺也称涎腺，位于口腔颌面部，涎腺组织对放射线高度敏感，头颈部恶性肿瘤放射治疗常常会导致涎腺功能障碍。涎腺功能障碍引起唾液分泌减少导致一系列不良症状，目前临床上无法从根本上恢复涎腺原有的功能[1]。近年来发现间充质干细胞在组织损伤领域具有广泛的应用前景，高洋等[2]将骨髓间充质干细胞与放射性损伤颌下腺细胞在体外进行共培养，结果发现骨髓间充质干细胞具有向颌下腺腺泡细胞转化的潜力，对损伤的颌下腺细胞起到一定的修复作用。课题组前期将人羊膜上皮细胞与腺泡细胞进行双室共培养，可诱导分化出高表达淀粉酶的腺泡样细胞，将人羊膜上皮细胞移植到放射性损伤的涎腺组织中，涎腺功能得到明显恢复[3-4]。王英鑫[5]将人羊膜间充质干细胞移植到小鼠涎腺放射性损伤模型中，结果发现腺泡细胞数量增多，间质纤维化明显好转。王涛等[6]实验结果表明脂肪干细胞治疗能促进唾液分泌，提高腺体细胞的增殖率，恢复涎腺功能。干细胞移植不仅能使唾液分泌量增加[7]，而且还可以恢复放射性涎腺组织，具有促进涎腺再分泌功能[8]。人羊膜间充质干细胞可以分泌多种细胞外基质、细胞因子、生长因子及生物活性蛋白，并且具有多向分化能力、较低的免疫原性和干细胞特性[9-11]，广泛运用于治疗骨损伤、脊柱损伤和神经疾病等[12-14]，是再生医学研究领域理想的种子细胞来源[15]。

目前将干细胞移植技术应用到临床疾病治疗面临着严重的问题，即移植干细胞存活率低以及到达病变部位产生作用的细胞少。为了解决这个难题，研究者发现低氧预处理可以激活间充质干细胞的生物学特性。体外实验研究发现不同体积分数氧气预处理人脂肪间充质干细胞可以提高血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、神经生长因子的 mRNA 转录，促进相关蛋白的分泌，其中以体积分数 1% 氧气预处理效果最为显著[16]。还有研究发现 3% 低氧预处理可提高人羊膜间充质干细胞的增殖活性、抗凋亡作用和旁分泌功能，并保持干细胞特性[17]。该实验探讨低氧预处理对人羊膜间充质干细胞形态、分化潜能、增殖活性、抗凋亡能力及其旁分泌作用的影响，以期研究最佳氧气预处理体积分数，为涎腺放射性损伤的功能修复研究提供最佳状态的细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 12 月至 2021 年 12 月在遵义医科大学基础药理教育部重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 人羊膜来源 经遵义医科大学附属医院伦理委员会批准 (YJSKTLS-2019-2021-027H)，医患沟通并签署同意书，术前排除传染性疾病，在遵义医科大学附属医院产科收集 5 份足月胎盘，钝性剥离获取人羊膜组织。

1.3.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰酶 (Gibco，美国)；青链霉素混合液、Ⅱ型胶原酶、Dnase Ⅰ酶、二甲基亚砜、凋亡检测试剂盒 (索莱宝，中国)；碱性成纤维生长因子 (联科，中国)；CCK-8 试剂盒 (同仁，日本)；血管内皮生长因子、神经生长因子、肝细胞生长因子、角质细胞生长因子酶联免疫吸附测定试剂盒 (伊莱瑞特，中国)；PCR 试剂盒 (诺唯，中国)。

1.3.3 主要仪器 二氧化碳培养箱、酶标仪 (Forma，美国)；三气培养箱 (Smartor，美国)；倒置相差显微镜 (Olympus，日本)；流式细胞仪 (Becton Dickinson，美国)；高速低温离心机 (Eppendorf，德国)；巴式吸管 (3 mL/5 mL)、透气培养瓶 (25 cm/75 cm)、离心管 (15 mL/50 mL)、培养板 (96 孔 /6 孔) (NEST，美国)；4 ℃ /−20 ℃ /−80 ℃冰箱、超净工作台 (海尔公司，中国)；PCR 仪 (东胜创新生物科技有限公司，中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 人羊膜间充质干细胞的分离培养、传代及表型鉴定

(1) 人羊膜间充质干细胞原代分离培养及传代：遵义医科大学附属医院手术室获取羊膜组织，转移至超净工作台内，PBS 冲洗表面血迹和黏液，剪碎羊膜组织，加入 1 ∶ 2 体积的 0.05% 胰酶，置于 200 r/min、37 ℃恒温水浴摇床消化 30 min，300 目滤网过滤，将滤网内羊膜组织再重复该过程消化、过滤 1 次，收集滤网内羊膜组织，加入 1 ∶ 2 体积现配制的Ⅱ型胶原酶，消化 1 h，过滤，收集滤液，终止消化，1 200 r/min、离心 7 min 后弃上清液，完全培养基 (DMEM/F12 基础培养基 90 mL、胎牛血清 10 mL、碱性成纤维生长因子 20 μL、青霉素链霉素混合液 1 mL) 重悬，接种于培养瓶 (即

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原代)，CO_2 培养箱内培养，每隔 2 d 换液 1 次。当细胞达瓶底 85%–90% 时，加入 0.125% 胰酶消化 2 min，镜下见细胞变圆时立即终止消化，1 200 r/min 离心 5 min 后弃上清，完全培养基重悬，以 1 ∶ 2 接种于培养瓶 (即第 1 代)。按上述方法将人羊膜间充质干细胞传至第 2 代。

(2) 人羊膜间充质干细胞流式表型鉴定：将第 2 代人羊膜间充质干细胞消化、计数，加入 PBS 将细胞浓度调整为 1.5×10^9 L^{-1}，取 15 支流式管分别加入 CD44、CD90、CD73、CD105、CD45/19/34/11b/HLA-DR-PE 抗体于试管底部，复孔 3 个，加入 100 μL 细胞悬液，混匀，避光孵育 30 min，加入流式洗涤液，1 000 r/min 离心 6 min，弃上清，再加入 1 mL 流式洗涤液，离心，弃上清，加入 400 μL PBS 重悬后上机检测。

人羊膜间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源：	人羊膜组织
原代培养方法：	酶消化法
基础培养基：	DMEM/F12 培养基
添加材料：	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素混合液、1% 碱性成纤维生长因子
原代培养时间：	原代细胞培养 2 d 开始换液，之后每隔 2 d 换液 1 次，培养 5–7 d 开始传代
细胞传代：	细胞融合至 85%–90% 用 0.125% 酶消化传至下 1 代，按 1 ∶ 2 比例传代，三四天传 1 代，共传 3 代
细胞鉴定：	流式细胞表型鉴定
伦理学批准：	该实验经过遵义医科大学附属医院伦理委员会批准

1.4.2 低氧预处理人羊膜间充质干细胞 第 3 代人羊膜间充质干细胞于 CO_2 培养箱培养 24 h，更换完全培养基后随机分为 5 组：1%，3%，5%，10% 低氧预处理组和常氧对照组 (体积分数 21% 氧气)，低氧预处理组置于三气培养箱内培养 48 h，常氧对照组置于 CO_2 培养箱培养 48 h，其余条件相同。

1.4.3 人羊膜间充质干细胞形态学鉴定 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞 48 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.4.4 CCK-8 法检测人羊膜间充质干细胞的增殖能力 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞 48 h，消化，计数，调整细胞浓度为 2×10^7 L^{-1}，以 100 μL/ 孔接种于 96 孔板，设置 4 个时间点，复孔 5 个，分别在 1，3，5，7 d 同一时间点加入 100 μL/ 孔 CCK-8 溶液 (完全培养基与 CCK-8 的体积比为 9 ∶ 1)，放入 CO_2 培养箱培养 2.5 h，酶标仪测波长 450 nm 处吸光度值。

1.4.5 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测人羊膜间充质干细胞的凋亡情况 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞 48 h，消化，计数，用 1 mL 的 Binding Buffer 重悬细胞，300×*g* 离心 10 min，弃上清，再用 1 mL 的 Binding Buffer 重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^9 L^{-1}，流式管内加入 100 μL 细胞悬液，复孔 3 个，加入 5 μL 的 Annexin V-FITC，混匀，避光孵育 10 min，加入 5 μL 的 PI，孵育 5 min，加入 PBS 至 500 μL 上机检测。

1.4.6 实时荧光定量 PCR 检测人羊膜间充质干细胞凋亡相关基因和缺氧诱导因子 1 的表达

(1) Trizol 法提取 RNA：不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞 48 h，各加入 1 mL Trizol 混匀，转移至无 RNase 的 EP 管中裂解 10 min，加入 200 μL 氯仿，剧烈颠倒混匀，室温条件下静置 5 min。超高速低温离心机 4 ℃、12 000 r/min 离心 8 min，可见样品分为 3 层，RNA 主要在上层水相中，吸入上层水相于 EP 管中，加入 400 μL 异丙醇，混匀后室温静置 10 min，同样条件下离心 10 min，EP 管底部白色沉淀即 RNA，弃上清，加入 1 mL 无 RNase 的体积分数为 75% 乙醇，涡旋，4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min，再次弃上清，上述同样条件下离心 5 min，弃上清，空气中干燥 RNA 沉淀物 8 min，将 RNA 溶于 20 μL 的 DEPC 水中，取 2 μL 的 RNA 用微量分光光度计测定 A_{260}、A_{280} 以及 A_{260}/A_{280} 值，计算 RNA 的纯度和浓度。根据 A_{260}/A_{280} 比值，预估 RNA 质量。根据吸光度值按下列公式计算样品 RNA 的浓度：总 RNA 浓度 (μg/μL)= $A_{260}\times40\times10^{-3}$，将各组总 RNA 放于 −80 ℃冰箱内保存备用。

(2) RT 反转录成 cDNA：反转录反应体系第一步：去除基因组 DNA，模板 RNA 2.888 μg，DNA wiper Mix 4 μL，RNase-free ddH_2O 补液至 16 μL，42 ℃下作用 2 min；第二步：配制反转录反应体系，HiScript II Select Q RT Super Mix II 5 μL 和第一步的反应液 16 μL 在 50 ℃条件下反应 15 min，85 ℃反应 5 s，4 ℃反应 10 min。

(3) 实时荧光定量 PCR 检测：将 cDNA 加入反应体系，在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测，反应体系：cDNA 4 μL，Forward Primer 0.4 μL，Reverse Primer 0.4 μL，SYBR Green Master Mix 10 μL，ROX Reference Dye 2 0.4 μL，H_2O 4.8 μL，反应程序：预变性阶段，95 ℃反应 10 min，1 个循环，变性阶段，设置温度 95 ℃，时间 15 s，40 个循环，退火延伸阶段，60 ℃反应 60 s，40 个循环，熔解曲线采集阶段，95 ℃维持 15 s，60 ℃维持 60 s，95 ℃维持 15 s，1 个循环。引物序列见**表 1**。

表 1 | NCBI 查找引物序列
Table 1 | **NCBI search primer sequences**

基因	引物	序列 (5'-3')	PCR 产物
β-actin	Forward	CCC TGG AGA AGA GCT ACG AG	180 bp
	Reverse	CGT ACA GGT CTT TGC GGA TG	
Bax	Forward	AAG AAG CTG AGC GAG TGT CT	236 bp
	Reverse	GTT CTG ATC AGT TCC GGC AC	
缺氧诱导因子 1	Forward	TCC AAG AAG CCC TAA CGT GT	180 bp
	Reverse	TGA TCG TCT GGC TGC TGT AA	
Bcl-2	Forward	TCC CCC AGT TCA CCC C	276 bp
	Reverse	GGC ACA CGC CCC ATC C	

1.4.7 ELISA 法检测人羊膜间充质干细胞分泌血管内皮生长因子、神经生长因子、肝细胞生长因子、角质细胞生长因子情况 收集 5 组人羊膜间充质干细胞上清液，按照说明书加样，37 ℃孵育 90 min，洗板，加生物素化抗体 100 μL/ 孔，孵育 60 min，加酶结合物 100 μL/ 孔，孵育 30 min，加显色剂 90 μL/ 孔，孵育 15 min，加终止液 50 μL/ 孔，大体观察见蓝

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

色转黄色时立即用酶标仪测波长 450 nm 处吸光度值。

1.5 主要观察指标 各组人羊膜间充质干细胞的增殖能力、抗凋亡作用和分泌细胞因子情况。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 21.0 软件将数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较用单因素方差分析，若方差齐，组间的两两比较采用 LSD 法；若方差不齐，组间比较采用 Dunnett's T3 法。文章统计学方法已经通过遵义医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 人羊膜间充质干细胞的鉴定结果 接种两三天后细胞贴壁，5−7 d 细胞融合达 85%，此时原代人羊膜间充质干细胞中混杂着人羊膜上皮细胞，传代可纯化人羊膜间充质干细胞，3−5 d 融合达 85%，细胞呈梭形、纺锤样，符合典型间充质干细胞形态，见**图 1**。流式检测 CD44、CD90、CD73、CD105 抗原呈阳性表达，而 CD45/19/34/11b/HLA-DR-PE 抗原表达呈阴性，见**图 2**，提取的细胞符合国际间充质干细胞鉴定规定。

倒置显微镜下观察低氧预处理的人羊膜间充质干细胞呈长梭形、纺锤样，生长呈放射状或漩涡状，细胞形态无明显变化，见**图 3**。

2.2 不同体积分数氧气预处理对人羊膜间充质干细胞增殖的影响 ①第 1 天：1%，3%，5% 低氧预处理组吸光度值均高于常氧对照组 ($P < 0.01$)，1% 低氧预处理组吸光度值高于 3%，5%，10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)，3% 低氧预处理组吸光度值高于 5% 低氧预处理组 ($P < 0.05$)，3%，5% 低氧预处理组吸光度值高于 10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)。②第 3 天：与常氧对照组相比，1% 低氧预处理组吸光度值显著增高 ($P < 0.01$)，3%，5%，10% 低氧预处理组吸光度值增高 ($P < 0.05$)，1% 低氧预处理组吸光度值高于 3%，5%，10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)。③第 5 天：1%，3%，10% 低氧预处理组吸光度值高于常氧对照组 ($P < 0.01$)，1% 低氧预处理组吸光度值高于 3%，10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)，1% 低氧预处理组吸光度值高于 5% 低氧预处理组 ($P < 0.05$)。④第 7 天：与常氧对照组相比，1%，3%，10% 低氧预处理组吸光度值显著增高 ($P < 0.01$)，5% 低氧预处理组吸光度值增高 ($P < 0.05$)；1% 低氧预处理组吸光度值高于 3%，5%，10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)，其余各组比较均无统计学差异，见**图 4**。

2.3 不同体积分数氧气预处理对人羊膜间充质干细胞凋亡的影响 各低氧预处理组凋亡百分比均低于常氧对照组 ($P < 0.01$)，1%，3% 低氧预处理组凋亡百分比低于 10% 低氧预处理组 ($P < 0.01$)，1% 低氧预处理组凋亡百分比低于 5% 低氧预处理组 ($P < 0.05$)，其余各组比较差异均无显著性意义，见**图 5**。结果显示低氧预处理组具有抗凋亡作用，其中以 1% 低氧预处理组抗凋亡能力效果较好。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测结果 各低氧预处理组促凋亡基因 Bax mRNA 表达量低于常氧对照组 ($P < 0.01$)，1% 低氧预处理组 Bax 表达量低于其余各组 ($P < 0.01$)；各低氧预处理组抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达量均高于常氧对照组，其中只有 5% 低氧预处理组有显著性意义 ($P < 0.01$)，其余各组间差异无统计学意义，见**图 6**。各低氧预处理组缺氧诱导因子 1 mRNA 表达量高于常氧对照组 ($P < 0.01$)，其余各组之间差异无显著性差异，见**图 7**。

2.5 各组人羊膜间充质干细胞分泌的细胞因子水平 1%，3%，5% 低氧预处理组血管内皮生长因子蛋白分泌量高于常氧对照组 ($P < 0.01$)，其余各组间两两比较差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)；各低氧预处理组神经生长因子、肝细胞生长因子、角质细胞生长因子蛋白分泌量高于常氧对照组 ($P < 0.01$)，其余各组间两两比较差异均有显著性意义 ($P < 0.01$)，见**图 8**。

3 讨论 Discussion

间充质干细胞源于胚胎发育早期中胚层，来源广泛，比如骨髓、脂肪组织、胎盘、脐带、脐血、羊膜组织、牙髓等 [18-20]，具有多向分化潜能和自我更新能力等。随着干细胞移植在再生医学领域兴起，间充质干细胞作为理想的种子细胞在再生医学研究领域广泛应用。人羊膜间充质干细胞来源于胎盘羊膜组织，具有来源丰富、采集方便、不会对患者造成二次伤害、无伦理道德限制、传至数代后仍能保持干细胞增殖分化特性、免疫原性低等特点 [21-24]，具有良好的应用前景，比如用于治疗放射性涎腺损伤及组织缺损的修复等 [25-26]，故该实验选取人羊膜间充质干细胞作为研究对象。目前间充质干细胞移植在临床上运用遇到难题，间充质干细胞移植后 24 h 内，90% 以上干细胞发生坏死或凋亡，严重影响了干细胞的有效性 [27-28]。因而，研究一种方法来提高间充质干细胞移植成功率成为关键。低氧预处理是目前认为安全有效并可在临床上运用的预处理策略。低氧预处理增强了间充质干细胞旁分泌作用，显著提高间充质干细胞促进组织损伤部位新生血管生成能力和细胞存活率 [29]，减少细胞内活性氧自由基的产生，从而增强移植的治疗效果。低氧预处理使间充质干细胞分泌细胞因子、生长因子、抗炎及免疫抑制相关因子增加 [30]，而且不同体积分数氧气、不同组织来源的间充质干细胞以及预处理时间不同均会对间充质干细胞的增殖活性、抗凋亡作用、旁分泌功能产生着不同影响，因此，研究低氧对间充质干细胞作用时必须严格控制实验条件。该实验通过预实验以及相关文献参考最终选取体积分数 1%，3%，5%，10% 氧气为低氧预处理组，体积分数 21% 氧气为常氧对照组，均预处理 48 h。不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞形态无明显差异，这与课题组前期研究 3% 低氧预处理人羊膜间充质干细胞不影响干细胞生长形态结论一致。各组细胞均具有成骨、成脂诱导分化潜能和干细胞特性，尚未进一步检测低氧预处理是否能够改变人羊膜间充质干细胞的成骨、成脂分化能力，还需进一步研究验证。

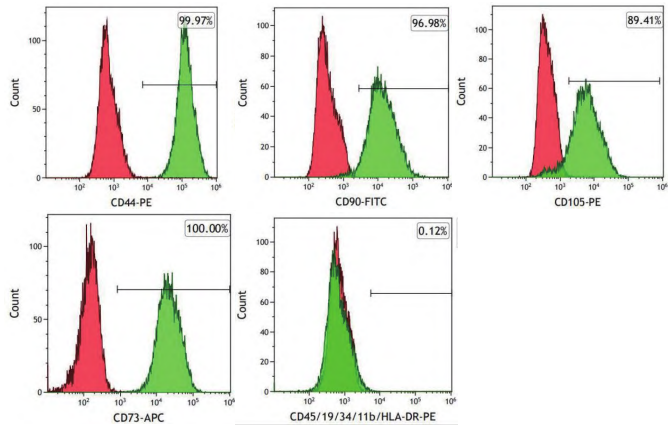
(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图注：图 A 为原代细胞，可见细胞呈短梭形；B 为第 1 代细胞，可见细胞呈梭形、纺锤样；C 为第 2 代细胞，可见细胞呈长梭形

图 1 | 倒置显微镜下观察人羊膜间充质干细胞形态 (标尺 =200 μm)

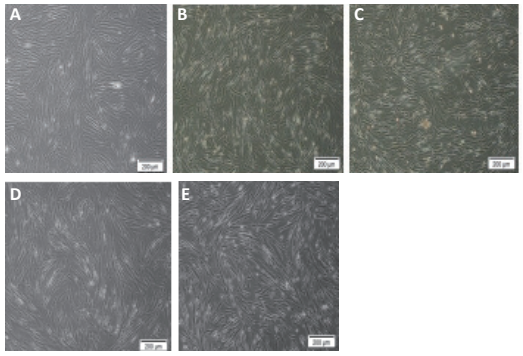
Figure 1 | Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells observed under an inverted microscope (scale bars = 200 μm)



图注：流式检测 CD44、CD90、CD73、CD105 抗原呈阳性表达，而 CD45/19/34/11b/HLA-DR-PE 抗原呈阴性表达

图 2 | 人羊膜间充质干细胞表面分子表型鉴定

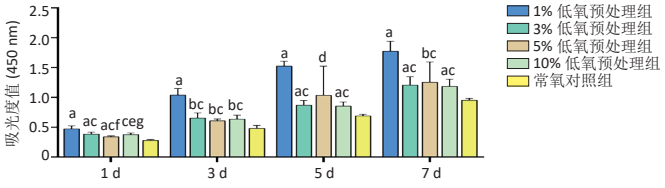
Figure 2 | Molecular phenotypic identification of human amniotic mesenchymal stem cells



图注：图 A–D 分别为 1%，3%，5%，10% 低氧预处理组；E 为常氧对照组 (体积分数 21% 氧气)

图 3 | 不同体积分数氧气预处理第 3 代人羊膜间充质干细胞 48 h 的形态学特征 (标尺 =200 μm)

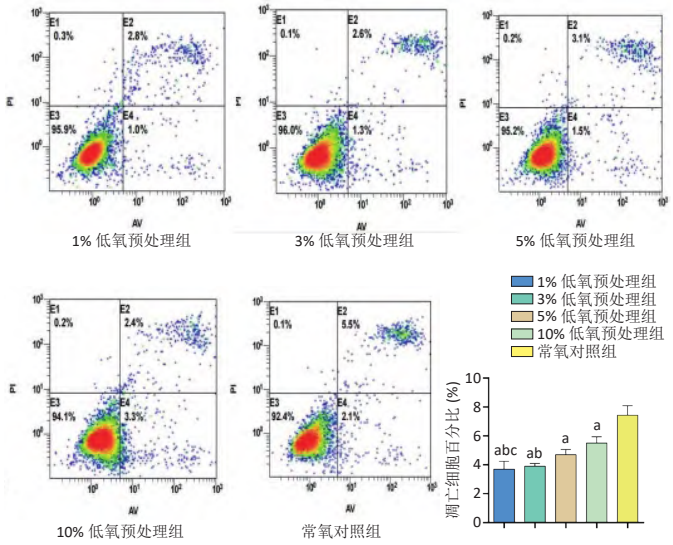
Figure 3 | Morphological characteristics of passage 3 human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different hypoxia concentrations for 48 hours (scale bars = 200 μm)



图注：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，n=5。与常氧对照组 (体积分数 21% 氧气) 比较，$^aP<0.01$，$^bP<0.05$；与 1% 低氧预处理组比较，$^cP<0.01$，$^dP<0.05$；与 3% 低氧预处理组比较，$^eP<0.01$，$^fP<0.05$；与 5% 低氧预处理组比较，$^gP<0.01$

图 4 | 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞的增殖情况

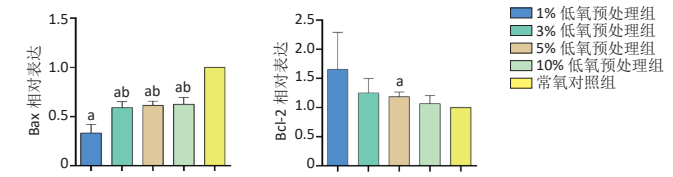
Figure 4 | Proliferation histogram of human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different hypoxia concentrations



图注：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，n=3。与常氧对照组 (体积分数 21% 氧气) 比较，$^aP<0.01$；与 10% 低氧预处理组比较，$^bP<0.01$；与 5% 低氧预处理组比较，$^cP<0.05$

图 5 | 不同体积分数氧气预处理对人羊膜间充质干细胞凋亡的影响

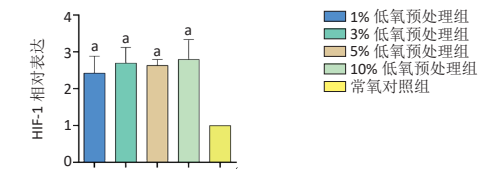
Figure 5 | Effects of different hypoxia concentrations on apoptosis of human amniotic mesenchymal stem cells



图注：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，n=3。与常氧对照组 (体积分数 21% 氧气) 比较，$^aP<0.01$；与 1% 低氧预处理组比较，$^bP<0.01$

图 6 | 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞凋亡相关基因表达

Figure 6 | Expression of apoptosis-related genes of human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different hypoxia concentrations



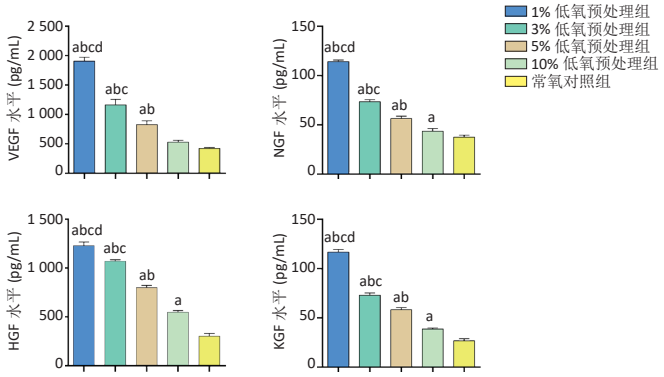
图注：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，n=3。与常氧对照组 (体积分数 21% 氧气) 比较，$^aP<0.01$

图 7 | 不同体积分数氧气预处理人羊膜间充质干细胞中缺氧诱导因子 1(HIF-1) 的表达

Figure 7 | Expression of hypoxia-inducible factor 1 gene in human amniotic mesenchymal stem cells pretreated with different hypoxia concentrations

间充质干细胞的增殖和迁移与组织修复密切相关。JUN 等[31]实验证明 1% 低氧预处理组与 5% 低氧预处理组对比，1% 低氧预处理组间充质干细胞具有更强的增殖能力。该实验利用 CCK-8 试剂盒检测不同体积分数氧气预处理组人羊膜间充质干细胞在第 1，3，5，7 天的增殖活性，结果表明低氧预处理可以增强人羊膜间充质干细胞的增殖能力，其中 1% 低氧预处理组细胞增殖能力高于其他低氧预处理组 (体积分数为 3%，5%，10% 氧气) 和常氧对照组 (体积分数为 21% 氧气)，但具体机制仍需进一步实验验证。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图注：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，n=3。与常氧对照组 (体积分数 21% 氧气) 比较，[a]P < 0.01；与 10% 低氧预处理组比较，[b]P < 0.01；与 5% 低氧预处理组比较，[c]P < 0.01；与 3% 低氧预处理组比较，[d]P < 0.01。VEGF：血管内皮生长因子；NGF：神经生长因子；HGF：肝细胞生长因子；KGF：角质细胞生长因子

图 8 | ELISA 法检测各组人羊膜间充质干细胞分泌的细胞因子水平

Figure 8 | Concentration of cytokine protein in human amniotic mesenchymal stem cells of each group detected by enzyme-linked immunosorbent assay

低氧预处理促进间充质干细胞增殖的机制可能与以下几个因素有关：第一是低氧条件下刺激体内缺氧诱导因子 1α 高表达，使得 ERK1/2 和 Akt 发生磷酸化改变，促进间充质干细胞增殖；第二是低氧抑制活性氧产生；第三是低氧可增加内源性 Ang Ⅱ表达，并激活醛固酮系统，促进间充质干细胞增殖 [32]。

许多研究证明了低氧预处理能提高间充质干细胞的抗凋亡作用，刘林奇 [33] 研究结果证明体积分数 1% 氧气预处理组较常氧组 (体积分数 21% 氧气) 细胞凋亡数较少，具有统计学意义，说明体积分数 1% 氧气预处理脂肪间充质干细胞具有抗凋亡作用。该实验采用凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡情况，结果显示各低氧预处理组均具有抗凋亡作用，其中以 1% 低氧预处理组抗凋亡作用较好。另外荧光定量 PCR 检测凋亡相关基因表达，结果表明各低氧预处理组促凋亡基因 Bax 表达量低于常氧对照组，1% 低氧预处理组 Bax 表达量低于其余各组，差异均有显著性意义，各低氧预处理组抗凋亡基因 Bcl-2 表达量均高于常氧对照组，其中只有 5% 低氧预处理组高于常氧对照组，差异有显著性意义，其余各组间无统计学意义，可能与样本量太少以及标准差过大相关。

越来越多的研究认为干细胞移植治疗效果主要是干细胞旁分泌机制起重要作用 [34]，HEO 等 [35] 实验研究发现低氧预处理人脂肪间充质干细胞用于修复损伤皮肤疗效更好，其机制可能是低氧预处理使细胞分泌更多碱性成纤维细胞生长因子和表皮细胞生长因子有关。MOEN 等 [36] 通过低氧预处理人羊膜间充质干细胞，证明了低氧预处理能使细胞分泌碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子增加，这些因子在干细胞旁分泌机制中起到关键作用。该实验通过 ELISA 试剂盒检测各组细胞分泌因子，结果显示低氧预处理提高了人羊膜间充质干细胞分泌蛋白能力，其中 1% 低氧预处理组血管内皮生长因子、神经生长因子、肝细胞生长因子、角质细胞生长因子蛋白分泌量较高，增强了人羊膜间充质干细胞旁分泌作用，这些旁分泌细胞因子不仅能保护周围组织细胞，同时也能提高自身的生存能力。

目前普遍认为缺氧诱导因子 1 是低氧预处理促进间充质干细胞增殖、抗凋亡及旁分泌作用的关键调节因子。JAFARINIA 等 [37] 研究发现低氧预处理骨髓间充质干细胞可以提高细胞增殖速率，其机制可能与 HIF-1α-TWIST 抑制 E2A 基因转录，下调 P21 蛋白表达相关。侯婧瑛等 [38] 实验证明 1% 低氧预处理骨髓间充质干细胞通过旁分泌作用促进体外人脐静脉内皮细胞存活和管状结构的形成，这些作用与缺氧诱导因子 1α 的活化相关。该实验通过实时荧光定量 PCR 检测各组细胞缺氧诱导因子 1 表达情况，结果表明低氧预处理各组缺氧诱导因子 1 表达量高于常氧对照组，差异有显著性意义，该实验低氧预处理具有促进人羊膜间充质干细胞增殖、抗凋亡作用及旁分泌作用可能与缺氧诱导因子 1 高表达相关，但其具体机制仍需进一步研究。

根据以上结果分析，不同体积分数氧气预处理 48 h 可以促进人羊膜间充质干细胞增殖、抗凋亡作用及增强旁分泌细胞因子能力，其中以体积分数 1% 氧气效果较好。因此，适当低氧预处理可激活人羊膜间充质干细胞生物学性能，使其更好地为修复放射性涎腺损伤提供理想的间充质干细胞。后续体内实验将使用体积分数为 1% 氧气预处理人羊膜间充质干细胞提取外泌体注射到放射性涎腺损伤腺体内，观察涎腺功能修复情况。

致谢：感谢贵州省细胞工程重点实验室、基础药理教育部重点实验室的支持与帮助。

作者贡献：唐建宏负责实验实施、细胞培养、指标检测、实验数据分析处理、论文撰写，张霓霓、黄桂林、龙远铸、崔田宁、骆勤亮、郎家婵、代敏、张立刚负责数据和文章的校对，唐建宏、张霓霓、黄桂林、龙远铸负责实验设计。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写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》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] 李审绥 , 吴沉洲 , 乔翔鹤 , 等 . 辐射损伤唾液腺机制及治疗的研究进展 [J]. 华西口腔医学杂志 ,2021,39(1):99-104.

[2] 高洋 , 张园 , 柯学平 , 等 . 骨髓间充质干细胞在放射性涎腺损伤中的修复作用 [J]. 江苏医药 ,2016,42(6):625-627.

[3] HUANG GL, ZHANG NN, WANG JS, et al. Transdifferentiation of human amniotic epithelial cells into acinar cells using a double-chamber system. Cell Reprogram. 2012;14(4):377-383.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] ZHANG NN, HUANG GL, HAN QB, et al. Functional regeneration of irradiated salivary glands with human amniotic epithelial cells transplantation. Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(10):2039-2047.
[5] 王英鑫 . 低氧预处理人羊膜间充质干细胞修复放射性涎腺损伤功能的研究 [D]. 遵义 : 遵义医学院 ,2018.
[6] 王涛 , 强艳丽 . 脂肪干细胞对小鼠放射性唾液腺损伤的治疗作用 [J]. 山东医药 ,2017,57(33):32-34.
[7] VISSINK A, VAN LUIJK P, LANGENDIJK JA, et al. Current ideas to reduce or salvage radiation damage to salivary glands. Oral Dis. 2015;21(1): e1-10.
[8] LOMBAERT I, MOVAHEDNIA MM, ADINE C, et al. Concise Review: Salivary Gland Regeneration: Therapeutic Approaches from Stem Cells to Tissue Organoids. Stem Cells. 2017;35(1):97-105.
[9] GOHI BFCA, LIU XY, ZENG HY, et al. Enhanced efficiency in isolation and expansion of hAMSCs via dual enzyme digestion and micro-carrier. Cell Biosci. 2020;10:2.
[10] BIAN Y, DU Y, WANG R, et al. A comparative study of HAMSCs/HBMSCs transwell and mixed coculture systems. IUBMB Life. 2019;71(7): 1048-1055.
[11] ZHANG C, DU Y, YUAN H, et al. HAMSCs/HBMSCs coculture system ameliorates osteogenesis and angiogenesis against glucolipotoxicity. Biochimie. 2018;152:121-133.
[12] CHEN W, XIAO S, WEI Z, et al. Schwann Cell-Like Cells Derived from Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration through a MicroRNA-214/c-Jun Pathway. Stem Cells Int. 2019;2019:2490761.
[13] LI Y, LIU Z, TANG Y, et al. Schnurri-3 regulates BMP9-induced osteogenic differentiation and angiogenesis of human amniotic mesenchymal stem cells through Runx2 and VEGF. Cell Death Dis. 2020;11(1):72.
[14] BIAN Y, MA X, WANG R, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells promote osteogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells against glucolipotoxicity. FEBS Open Bio. 2018;9(1):74-81.
[15] 肖建辉 . 人羊膜干细胞 : 再生医学的理想种子细胞资源 [J]. 遵义医学院学报 ,2015,38(5):439-449.
[16] 姜亦瑶 , 刘晓程 , 裴宇 , 等 . 不同氧分压时人脂肪干细胞细胞因子的分泌 [J]. 中国组织工程研究 ,2013,17(45):7861-7868.
[17] 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.
[18] LISINI D, NAVA S, POGLIANI S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for clinical application: An efficient isolation approach. Curr Res Transl Med. 2019;67(1):20-27.
[19] ANGELOPOULOS I, BRIZUELA C, KHOURY M. Gingival Mesenchymal Stem Cells Outperform Haploidentical Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation Rate, Migration Ability, and Angiogenic Potential. Cell Transplant. 2018;27(6):967-978.
[20] GASIŪNIENĖ M, PETKUS G, MATUZEVIČIUS D, et al. Angiotensin II and TGF-β1 Induce Alterations in Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Leading to Cardiomyogenic Differentiation Initiation. Int J Stem Cells. 2019;12(2):251-264.
[21] GASIŪNIENĖ M, VALATKAITĖ E, NAVAKAUSKIENĖ R. Long-term cultivation of human amniotic fluid stem cells: The impact on proliferative capacity and differentiation potential. J Cell Biochem. 2020;121(7):3491-3501.
[22] 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. Am J Sports Med. 2017;45(11): 2637-2646.
[23] YANG L, ZHU S, LI Y, et al. Overexpression of Pygo2 Increases Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocyte-like Cells. Curr Mol Med. 2020;20(4):318-324.
[24] DAVIDSON JO, DHILLON SK, BENNET L. Preterm neonatal brain injury: are human amnion epithelial stem cells a pan-treatment for neuroprotection and neurorepair? Neural Regen Res. 2022;17(6): 1261-1262.
[25] KIM SW, ZHANG HZ, KIM CE, et al. Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model. Int J Cardiol. 2013;168(2):1062-1069.
[26] KIM SW, ZHANG HZ, GUO L, et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. PLoS One. 2012;7(7):e41105.
[27] 陈晶 , 刘清岩 , 张海宁 , 等 . 脂肪干细胞来源的外泌体对 2 型糖尿病肾病大鼠的保护作用 [J]. 解剖科学进展 ,2020,26(4):369-373.
[28] SCEPANOVIC G, FLOREA A, FERNANDEZ-GONZALEZ R. Multiscale In Vivo Imaging of Collective Cell Migration in Drosophila Embryos. Methods Mol Biol. 2021;2179:199-224.
[29] LIU W, LI L, RONG Y, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126. Acta Biomater. 2020;103:196-212.
[30] VIZOSO FJ, EIRO N, CID S, et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2017;18(9):1852.
[31] JUN EK, ZHANG Q, YOON BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF-β/SMAD2 and PI3K/Akt pathways. Int J Mol Sci. 2014;15(1):605-628.
[32] 侯萍 , 宋志国 , 李晓丰 , 等 . 低氧对间充质干细胞生物学特性影响及相关机制研究进展 [J]. 解剖科学进展 ,2021,27(5):628-630.
[33] 刘林奇 . 低氧预处理的人脂肪来源干细胞促进血管生成的体外实验研究 [D]. 广州 : 南方医科大学 ,2013.
[34] LIU J, REN J, SU L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells inhibit the activity of keloid fibroblasts and fibrosis in a keloid model by paracrine signaling. Burns. 2018;44(2):370-385.
[35] HEO DN, HOSPODIUK M, OZBOLAT IT. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2019;95(11): 348-356.
[36] MOEN SH, WESTHRIN M, ZAHOOR M, et al. Caspase-8 regulates the expression of proand anti-inflammatory cytokines in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Immun Inflamm Dis. 2017; 4(3):327-337.
[37] JAFARINIA M, ALSAHEBFOSOUL F, SALEHI H, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy. Immunol Invest. 2020;49(7):758-780.
[38] 侯婧瑛 , 于萌蕾 , 郭天柱 , 等 . 缺氧预处理激活 HIF-1α/MALAT1/VEGFA 通路促进骨髓间充质干细胞生存和血管再生 [J]. 中国组织工程研究 ,2021,25(7):985-990.

(责任编辑：MZH，ZN，ZH)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net