

羊膜的结构功能特性和临床应用

于洪蛟 徐 林 张立阳 李永华 梁洪生 张相彤

摘 要 经过多年的研究,可以了解羊膜的组织结构和功能特性,特别是羊膜来源细胞的多向分化潜能。羊膜含有多种生物活性物质,具有抗炎、抗菌、抗病毒、低免疫原性、非致瘤性等特性。羊膜移植生物相容性好,能促进上皮再生、减轻不良反应,并且无伦理争议等。羊膜临床应用广泛,特别是在治疗眼表疾病、皮肤损伤、膜性组织损伤等方面。随着研究深入,羊膜在抗肿瘤上也崭露头角,如羊膜来源细胞能抑制癌细胞增殖和促进其凋亡等,值得进一步研究。

关键词 羊膜 特性 临床应用 抗肿瘤

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.050

羊膜是胎盘的最内层光滑、无血管、神经及淋巴的半透明薄膜,作为一种良好的生物材料,羊膜因其独特的结构功能属性已被广泛应用于基础研究和临床。早在20世纪初,就有文献报道将羊膜应用于皮肤移植,治疗皮肤烧伤和溃疡。随着研究的深入,羊膜移植在眼表重建、皮肤损伤修复中取得了突破性进展。近年来,羊膜被认为是一种治疗与眼、口腔、皮肤、泌尿生殖道等相关疾病的新策略,在抗肿瘤方面也逐渐被人们所关注^[1,2]。本文重在介绍羊膜的结构功能特性及常见的临床应用。

一、羊膜的结构和功能

羊膜厚度约0.02~0.5mm,由内向外由单层上皮层、薄的基膜层、厚的间质层3层构成^[1,3]。上皮细胞呈立方形,核大而不规则,胞质丰富,具有丰富的胞饮小泡和细胞器,表面有很多具有活跃的分泌和转运功能的微绒毛。上皮细胞表达多种细胞标志物,如糖蛋白CA125、缩宫素受体,CD44和肌间丝蛋白抗原也呈阳性。人羊膜上皮细胞还表达促红细胞生成素及其受体,在羊膜中的功能依然未知。基膜中含有大量的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,对羊膜高分子物质起到渗透屏障作用,并与膜收缩蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白等共同维持着羊膜结构的完整性。间质层又可分为致密层、纤维细胞层和海绵层。致密层含有丰富的胶原纤维,纤维细胞层是主要由纤维母细胞组成的松散的网格状结构,海绵层含有丰富的蛋白聚糖、糖蛋

白和Ⅲ型胶原蛋白,羊膜很容易在海绵层从绒毛膜层上钝性分离^[3]。

羊膜最基本的功能是保护胚胎/胎儿并为其发育提供适宜的悬浮液体环境,缓冲周围的压力使胎儿能自由的、活动的生长。羊膜含有的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原蛋白和弹性蛋白,使其能抵抗一定的张力,并具有一定的弹力。羊膜能转运多种可溶性物质,并能合成分泌多种生物因子,如血管活性肽、生长因子、细胞因子等。怀孕期间羊膜上皮细胞代谢活跃,对于维持羊水恒定的pH值有重要作用。在分娩时羊膜也具有重要作用,前列腺素是诱发子宫收缩的主要内源性因子,起着诱发破膜、启动和维持宫缩等作用,羊膜高表达前列腺素合成酶的关键酶,可以合成高浓度的前列腺素^[4]。

二、羊膜的特性

1. 羊膜细胞的多向分化潜能:羊膜细胞主要是由来源于外胚层的上皮和来源于中胚层的间充质两类细胞构成,表达与胚胎干细胞相关的标志物,如SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81等,具有多向分化潜能,可诱导分化成为3个胚层不同类型的细胞,在细胞治疗中有很大的应用潜力^[2]。(1)肝细胞:羊膜上皮细胞表达白蛋白、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、角蛋白18等和其他肝细胞相关的基因。此外,在羊膜上皮细胞中也发现参与肝细胞转录过程中的调节基因肝细胞转录因子亚型3 γ (HNF-3 γ)和转录因子CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)。HNF-3 γ 主要诱导白蛋白、甲胎蛋白、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、转甲状腺素蛋白的表达,C/EBP α 可调控糖原的储存、白蛋白、甲胎蛋白、酪氨酸转氨酶的表达羊膜上皮细胞可诱导分化为肝细胞样细胞,并表现出蛋白合成和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81041082);黑龙江省杰出青年科学基金资助项目(2011M501059)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科

通讯作者:张相彤,教授,电子信箱:zgxtgtg@sina.com

分泌、糖原储存、尿素的合成、细胞色素 P450 - 3A4 (CYP3A4) 的表达、低密度脂蛋白的摄取等肝细胞功能,也表达一些参与脂肪、胆固醇、胆汁酸合成有关的基因^[2,5]。以上表明,人羊膜上皮细胞和(或)羊膜移植可成为治疗肝脏疾病的新途径。(2) 心肌细胞:成人心肌细胞几乎没有再生能力,细胞心肌成形术是治疗严重心脏疾病的新方法。羊膜间充质细胞表达心肌特异性转录因子 GATA4,心肌特异性基因,如肌球蛋白轻链(MLC) - 2a、MLC - 2V、cTNI、cTNT、心脏特异性 L - 型钙离子通道和外向瞬时钾离子通道的 α 亚基。通过碱性成纤维细胞生长因子或激活素 A 等特定因子的刺激,羊膜间充质细胞能表达心肌特异性转录因子(Nkx2.5)和心肌特异性标志物(心房利钠肽)^[6]。GATA4 和 Nkx2.5 调节心肌特异性基因的表达,是心肌前体细胞最早期的标志,它们的激活意味着心肌细胞分化程序的启动。共培养实验证实,间充质细胞能够融入心脏组织并有与心脏组织同步的自发收缩能力,表达心脏特异性标志物^[6]。(3) 软骨细胞:羊膜细胞表达软骨细胞相关基因,如 SOX 家族、骨形成蛋白(BMP)及其受体^[2,7]。羊膜细胞在体外通过特定物质的诱导后表达软骨细胞特异性标志物 COMP、AGC1、CSPG2、COL1A1、COL9A2、MIA 等,并在培养基质中发现糖胺聚糖(GAG)的积累,具有典型的软骨细胞的形态和功能特性,可成为骨组织工程的种子细胞^[8]。羊膜细胞经过 PKH26 标记后与 PLGA 载体植入兔膝关节后,细胞能存活且有较好的生物相容性,显示了羊膜细胞在治疗软骨疾病的潜在价值^[7]。(4) 胰岛 β 细胞:胰岛 β 细胞移植开辟了治疗晚期糖尿病的新的途径,然而常因供体细胞稀少而受限。研究报道,人羊膜上皮细胞可诱导分化为产生胰岛素的功能细胞,表达多个胰岛 β 细胞基因,在移植入链脲霉素诱发型糖尿病小鼠后,能合成和分泌胰岛素,可使血糖水平正常化^[9]。表明羊膜上皮细胞在体内具有分化成胰岛 β 细胞的潜力,对 1 型糖尿病有潜在的治疗价值。(5) 神经细胞:羊膜细胞表达多种神经元和胶质细胞标志物,如波形蛋白、神经纤丝蛋白等,还能以合成和释放乙酰胆碱、儿茶酚胺、多巴胺、激活素、Noggin 及各种神经营养因子^[10]。人羊膜细胞表达神经前体细胞的标志物,并能分化成神经元,多巴胺能神经元,星形胶质细胞和少突胶质细胞;移植入帕金森大鼠侧脑室后,羊膜细胞能分化成酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞,改善大鼠的帕金森症状,并能促进大鼠内源性神经再生^[11]。羊膜间充质干细

能诱导分化成神经干细胞样细胞,表达更高水平的神经干细胞标志物和神经营养因子,移植入体内能促进大鼠脑损伤的修复^[10]。(6) 听觉系统:体外培养的人羊膜上皮细胞的细胞膜和细胞核上表达间隙连接蛋白 Cx26,在细胞膜上和细胞质中还表达钠钾泵,此为耳蜗成纤维细胞的特有属性,成纤维细胞维持着耳蜗的正常组织结构和功能,表明羊膜上皮细胞有作为功能性成纤维细胞使用的可能。移植入豚鼠耳蜗后,羊膜上皮细胞能持续 3 周表达 Cx26 和钠钾泵,为进一步研究提供了依据^[12]。

2. 抗炎、抗菌、抗病毒、低免疫原性:羊膜具有抗炎、抗菌、抗病毒性和低免疫原性,是较理想的移植物。其机制尚未完全清楚。一方面,羊膜作为物理屏障,可阻止炎性细胞的浸润,并能吸引、诱捕炎性细胞,从而降低炎性介质的释放。羊膜移植后可防止死腔形成、减少分泌物的积聚,基质的胶原纤维还具有止血效果,可防止术后血肿形成从而降低感染风险^[1]。另一方面,羊膜表达一些抗菌肽,如防卫素、弹力素及分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI)等,具有抗炎、抗感染作用^[13]。羊膜细胞能合成分泌多种抗炎因子,如 IL - 1 和 IL - 2 受体拮抗剂、内皮抑制素等,减轻炎性反应。羊膜上皮细胞的上清液可抑制中性粒细胞和巨噬细胞的趋化活性,减少 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖并诱导其凋亡。此外,羊膜还表达一些基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂,能抑制 MMPs 参与的炎性反应、血管重建等病理反应^[1]。羊膜富含的胶原蛋白是细胞外基质的主要成分,哺乳动物同型胶原的氨基酸种类、排列、数目基本相同,具有良好的生物相容性。羊膜细胞表达免疫抑制因子 CD59 和 HLA - G 等,具有一定的免疫抑制功能。羊膜移植后免疫应答微不足道,未出现明显的排斥反应,似乎是无免疫原性的组织。然而关于羊膜免疫应答的研究报道较少,对于新鲜羊膜和保存羊膜的免疫原性和临床应用仍然存在争议,随着研究应用的深入,羊膜移植的免疫安全性也日益被人们所关注。

3. 抗新生血管形成:人羊膜能抑制角膜新生血管的形成,降低角膜表面的血管化,对治疗角膜疾病有很重要的作用。一方面可能为羊膜作为物理屏障可抑制血管内皮细胞的增殖和迁移,从而阻断新生血管的形成。另一方面,羊膜基质中含有大量的诸如层粘连蛋白 - 1、- 5,纤连蛋白,胶原蛋白 VII 等,均参与抑制角膜新生血管的行成。此外,羊膜细胞还合成各种生物活性物质,包括抗血管形成因子、内皮抑素和血

血小板反应蛋白-1(TSP-1)。TSP-1能抑制由VEGF或bFGF诱导的血管形成,内皮抑素是目前已知最强的内源性血管形成抑制因子,抑制内皮细胞增殖、迁移、黏附,促进凋亡、抑制促血管形成因子的生物学作用。羊膜能表达色素上皮衍生因子(PEDF)、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、IL-10等都能抑制血管形成的过程^[14]。

4. 促进上皮生成和抗纤维化:羊膜能作为良好的细胞外基质能增强上皮细胞的黏附、促进增殖迁移、抑制凋亡,促进上皮形成^[15]。羊膜中存在表皮生长因子(EGF)、角质细胞生长因子(KGF)、肝细胞生长因子(HGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)等促进伤口愈合的生物活性物质,特别是EGF和KGF,能促进上皮细胞增殖和迁移,在创口愈合中有重要作用。新鲜羊膜含有丰富的高分子质量的透明质酸,不仅有利于细胞迁移,还具有一些抗炎和免疫抑制功能^[1]。瘢痕组织的形成主要因成纤维细胞的过度增生,TGF- β 能激活成纤维细胞,而羊膜能抑制TGF- β 受体在成纤维细胞中的表达从而抑制纤维化。角膜受损可引起角膜成纤维细胞的凋亡,激发角膜基质细胞活化增生,引起一系列的角膜损伤修复反应。羊膜可减轻由IL-1诱导的细胞凋亡,从而减轻角膜成纤维细胞的活化增生,在减轻角膜损伤的修复和抗瘢痕形成中有重要作用。由此可见,羊膜促进创口的愈合是通过调控组织的重建而非促进瘢痕组织的形成。

5. 非致瘤性和无伦理争议:羊膜上皮细胞缺乏端粒酶,无法在体外无限扩增,克服了细胞移植后在宿主体内致癌的可能,具有非致瘤性。至今为止,动物实验中接受羊膜及羊膜细胞移植后的实验动物患者未有致瘤性报告。分娩后的胎盘通常是作为废弃物处理的,羊膜的取材无伦理道德争议,通过伦理委员会的批准和捐赠者的同意羊膜在临床上应用可以推广。为了保证羊膜的质量,捐赠者必须经过血清学检验,保证无传染性和恶性肿瘤疾病,建议选择自愿的剖宫产妇女。

三、羊膜的临床应用

1. 眼表重建:羊膜移植能重建眼表结构、维持眼表稳定,使受损的角膜或结膜快速上皮化,减少瘢痕形成,减轻炎症反应,减轻睑球粘连、抑制角膜血管化、提高视力等,在治疗各种原因所致的眼表损伤、溃疡、眼表肿瘤、难治性青光眼等疾病中取得了良好的效果,具有明显的优势。近年来,在治疗限制性斜视上羊膜也逐渐获得青睐,羊膜移植后能防止术后瘢痕

形成、减轻偏向角、改善了转向^[15,16]。

2. 皮肤修复:如何在治疗烧伤、创伤、脉管系统疾病等患者的皮肤损伤中使伤口达到最佳愈合效果,一直是人们的研究焦点。羊膜辅料具有天然的生物基质并含有一些生物活性物质,具有抗炎、抗感染、促进上皮再生、减轻疼痛、减少渗出等性能,临床应用于皮肤的修复均取得了良好效果,与其他辅料相比具有明显的优势。特别是在治疗慢性不愈创口上,羊膜能抑制基质金属蛋白酶(MMPs)相关的炎症反应,抑制组织的破坏,减少了伤口渗出和色素沉着,加速伤口的愈合^[17]。

3. 术后防粘连:Asherman综合征是由于刮宫时损伤宫颈管黏膜或子宫内膜基底层、肌层、局部创面形成而致粘连,临床常见闭经、月经减少或不孕,多次人工流产、术后感染及术后卵巢功能低下易引起。首选治疗方法为宫腔镜,临床报道,在宫腔镜松解后应用羊膜移植能显著减少术后粘连复发和增强子宫内膜再生^[18]。

4. 膜性组织修复:羊膜也被广泛应用于泌尿生殖道的修复和重建、口腔鼻腔黏膜的修复,有助于组织损伤的修复和功能的恢复。Koziak等^[19]首次报道应用羊膜进行男性尿道的重建,对治疗男性尿道狭窄提供了新的策略,随后,羊膜应用于输尿管狭窄的重建也取得了良好效果。Arai等^[20]应用羊膜修复口腔黏膜能很好地与裸露的结缔和肌肉组织结合,减少出血,促进口腔黏膜的再生。

四、羊膜与再生医学

羊膜来源细胞具有多向分化潜能、低免疫原性、非致瘤性等,能分泌和成多种生物活性物质,在细胞工程中具有很大的应用前景。动物实验证实,羊膜来源细胞移植治疗心肌梗死、肝脏疾病、糖尿病、软骨疾病、帕金森病等疾病均取得了理想效果^[6-12]。羊膜作为天然无毒的高分子材料,组织相容性好,易于细胞黏附,来源广泛,易于塑型等优点,是较理想的生物载体和支架材料。可应用于构建组织工程皮肤、血管、角膜、神经等,具有很大的应用前景^[3]。

五、羊膜潜在的抗肿瘤价值

近年来,羊膜的抗肿瘤作用逐渐被人们所关注。Niknejad等报道羊膜上皮细胞可诱导癌细胞的凋亡,同时羊膜能减少肿瘤新生血管的形成,阻止了肿瘤营养物质和氧的供应,从而减轻肿瘤生长、转移的风险。羊膜细胞表达的一些白介素如IL-2、IL-4和IL-3,能增强自然杀伤细胞(NK)的细胞杀伤活性,增强

对肿瘤细胞的攻击,限制肿瘤的生长。Magatti 等报道羊膜间充质细胞能诱导癌细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,减少癌细胞的增殖。干细胞治疗为肿瘤的研究治疗提供了新的方向和新的靶点。羊膜来源干细胞具有高速增殖能力,也表达多能干细胞特定标志物 OCT4,在体外具有分化为 3 种胚层细胞的潜能。并且具有无致瘤性、低免疫原性、抗感染、来源广泛、易于分离取材等优点,为抗肿瘤提供了新的细胞源。羊膜来源干细胞含有某些生物活性物质,能改变细胞生长周期,从而能消弱肿瘤的生长。在 Mencucci 等的研究中,应用抗病毒药处理过的羊膜在体外可以抑制病毒的复制,表明羊膜具有吸收抗病毒药物和维持药物释放的能力。这项研究为控制药物的释放开辟了新的途径,药物溶浸后的羊膜可能在治疗其他疾病方面发挥重要作用,在肿瘤治疗上也值得进一步研究。

综上所述,羊膜作为天然的生物材料来源广泛、易于取材,含有多种生物活性物质,具有抗炎、抗菌、抗病毒、低免疫原性、抑制新生血管形成、促进上皮再生、非致瘤性等特性,羊膜细胞具有多向分化潜能,能分化成肝细胞、心肌细胞、软骨及成骨细胞、胰岛 β 细胞等。在眼表重建、皮肤损伤修复、组织工程等方面有很大的应用价值,在抗肿瘤方面仍需进一步探究。

参考文献

- 1 Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing[J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(4): 451 - 456
- 2 Diaz - Prado S, Muinos - Lopez E, Hermida - Gomez T, *et al.* Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine[J]. Differentiation, 2011, 81(3): 162 - 171
- 3 Okabe M, Kitagawa K, Yoshida T, *et al.* Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(3): 862 - 870
- 4 Alzamil HA, Pawade J, Fortier MA, *et al.* Expression of the prostaglandin f synthase akrlb1 and the prostaglandin transporter slco2a1 in human fetal membranes in relation to spontaneous term and preterm labor [J]. Front Physiol, 2014, 30, (5): 272
- 5 Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, *et al.* Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells[J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1719 - 1729
- 6 Otaka S, Nagura S, Koike C, *et al.* Selective isolation of nanog - positive human amniotic mesenchymal cells and differentiation into cardiomyocytes[J]. Cell Reprogram, 2013, 15(1): 80 - 91
- 7 Nogami M, Tsuno H, Koike C, *et al.* Isolation and characterization of

- human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation[J]. Transplantation, 2012, 93(12): 1221 - 1228
- 8 Lindenmair A, Nurnberger S, Stadler G, *et al.* Intact human amniotic membrane differentiated towards the chondrogenic lineage[J]. Cell Tissue Bank, 2014, 15(2): 213 - 225
- 9 Hou Y, Huang Q, Liu T, *et al.* Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin - producing cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008, 40(9): 830 - 839
- 10 Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, *et al.* Neural stem - like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat[J]. Neurochem Res, 2013, 38(5): 1022 - 1033
- 11 Yang X, Song L, Wu N, *et al.* An experimental study on intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells in a rat model of parkinson's disease[J]. Neurol Res, 2010, 32(10): 1054 - 1059
- 12 Yuge I, Takumi Y, Koyabu K, *et al.* Transplanted human amniotic epithelial cells express connexin 26 and Na - K - adenosine triphosphatase in the inner ear[J]. Transplantation 2004, 77(9): 1452 - 1454
- 13 Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane[J]. Cryobiology, 2013, 67(3): 293 - 298
- 14 hay E, He H, Sakurai S, *et al.* Inhibition of angiogenesis by hc. ha, a complex of hyaluronan and the heavy chain of inter - alpha - inhibitor, purified from human amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(5): 2669 - 2678
- 15 Celik T, Katircioglu YA, Singar E, *et al.* Clinical outcomes of amniotic membrane transplantation in patients with corneal and conjunctival disorders[J]. Semin Ophthalmol, 2013, 28(1): 41 - 45
- 16 Tugcu B, Helvacioğlu F, Yuzbasioglu E, *et al.* Amniotic membrane in the management of strabismus reoperations[J]. Jpn J Ophthalmol, 2013, 57(2): 239 - 244
- 17 Litwiniuk M, Bikowska B, Niderla - Bielinska J, *et al.* Potential role of metalloproteinase inhibitors from radiationsterilized amnion dressings in the healing of venous leg ulcers[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(4): 723 - 728
- 18 Johary J, Xue M, Zhu X, *et al.* Efficacy of estrogen therapy in patients with intrauterine adhesions: systematic review[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2014, 21(1): 44 - 54
- 19 Koziak A, Salagierski M, Marcheluk A, *et al.* Early experience in reconstruction of long ureteral strictures with allogenic amniotic membrane[J]. Int J Urol, 2007, 14(7): 607 - 610
- 20 Arai N, Tsuno H, Okabe M, *et al.* Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2012, 70(9): 2221 - 2228

(收稿日期: 2015 - 01 - 20)

(修回日期: 2015 - 02 - 29)