

人尿源干细胞的分离与鉴定

王福平^{1, 2} 张锋¹ 赵同标²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 071002; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 为建立高效简便的人尿源干细胞 (Human urine-derived stem cells, hUSCs) 培养和鉴定体系, 在无菌条件下收集青年志愿者的尿液分离培养人尿源干细胞, 然后用克隆计数、形态观察、核型分析、生长曲线测定、表面标志物检测、成骨和成脂分化等方法对 hUSCs 进行鉴定。人尿源干细胞克隆具有纤维样、鹅卵石样和丝连接三种形态。第二代 hUSCs 高表达抗原 CD44、CD73 和 CD90, 阳性率均高于 99.6%; 而低表达抗原 CD34 和 CD45, 阳性率均低于 0.3%。第六代 hUSCs 高表达抗原 CD44 和 CD73, 阳性率均高于 99.5%; 而低表达抗原 CD34 和 CD45, 阳性率均低于 0.5%。第六代 hUSCs 仍然具有很强的增殖能力和稳定的核型, 并经诱导可分化为骨细胞和脂肪细胞。该研究建立了高效简便的 hUSCs 培养和鉴定体系。

关键词: 人尿源干细胞; 生长曲线; 表面标志; 种子细胞; 再生医学

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0312

Isolation and Identification of Human Urine-derived Stem Cells

WANG Fu-ping^{1, 2} ZHANG Feng¹ ZHAO Tong-biao²

(1. School of Life Science, Hebei University, Baoding 071002; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101)

Abstract: In order to establish an efficient and convenient system for the cultivation and identification of human urine-derived stem cells (hUSCs), urine samples from young volunteers were collected under aseptic conditions to isolate and culture hUSCs. The clone assay, morphological observation, karyotype analysis, growth curve determination, surface marker detection, osteogenic and adipogenic differentiation were utilized to identify the hUSCs. The clones of hUSCs were in three types of fiber-like, pebble-like and silk-like. For the second passage hUSCs highly-expressed antigens CD44, CD73 and CD90, the positive rates were higher than 99.6%; while for the lowly-expressed antigens CD34 and CD45, the positive rates were less than 0.3%. For the sixth passage hUSCs highly-expressed antigens CD44 and CD73, and the positive rates higher than 99.5%; while for the lowly-expressed antigens CD34 and CD45, the positive rates were less than 0.5%. The sixth passage hUSCs still had strong proliferative ability and stable karyotype, and was induced to differentiate into osteocyte and adipocyte. By this research, the efficient and convenient hUSCs culture and identification systems are established.

Key words: human urine-derived stem cells; growth curve; surface marker; seed cell; regenerative medicine

人尿源干细胞 (Human urine-derived stem cells, hUSCs) 是人尿液中具有良好增殖活性和多向分化能力的成体干细胞, 约占尿液中存活细胞的 0.2%, 具有间充质干细胞的各种生物学特性^[1]。hUSCs 具有来源广泛、取材安全、操作简单、成本低、自我更新和多向分化能力强等优点, 是再生医学理想的种子细胞来源^[2]。目前细胞治疗和组织工程处于快速

发展期, 人们已经开始探索利用 hUSCs 来实现疾病治疗、组织再生或器官重建, 例如利用 hUSCs 进行个体化的肾遗传疾病的治疗^[3]、hUSCs 与 β -TCP 结合可以应用于骨再生^[4]、通过激活信号通路的 Wnt/ β -catenin 诱导 hUSCs 为成骨细胞^[5]、移植过表达血管内皮生长因子的自体 hUSCs 重建泌尿生殖器^[6]等。除了人尿源干细胞本身有多种用途, hUSCs 还

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA16030302), 中国科学院重点部署项目 (ZDRW-ZS-2015)

作者简介: 王福平, 男, 硕士研究生, 研究方向: 干细胞与免疫学; E-mail: wangfuping10@163.com

通讯作者: 张锋, 男, 教授, 研究方向: 蛛形生物学; E-mail: dudu06042001@163.com

赵同标, 男, 研究员, 研究方向: 干细胞与免疫学; E-mail: tbzhao@ioz.ac.cn

可以重编程为高质量的诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs), 给 iPSCs 的临床应用带来光明前景^[7]。2012 年, 研究人员利用逆转录病毒成功将 hUSCs 重编程为 iPSCs, 并经克隆形态、AP 染色、SSEA-4 表达和三胚层分化等验证其为高质量的 iPSCs^[8]。采用逆转录病毒实现重编程得到的 iPSCs 安全性低, 应用临床风险大, 因此研究人员努力探索如何通过非整合的方法实现 hUSCs 重编程为 iPSCs。2017 年, 美国科学家成功利用仙台病毒的非整合方法实现了尿源干细胞的重编程, 得到了克隆形态良好、细胞核型正常和多能性标志物高表达的 iPSCs, 使 hUSCs 的应用价值得到提升。

人尿液中存活的细胞可分为终末分化的细胞、未完全分化的祖细胞和未分化的干细胞, 其中未分化的干细胞就是人尿源干细胞^[9]。早在 1972 年, Sutherland 和 Bain^[10] 在 *Nature* 上首次报道新生儿尿液中脱落细胞的成功培养, 这些在尿液中分离和培养的细胞主要来自于肾单元、输尿管、膀胱和尿道等脱落的上皮细胞^[11]。1991 年, 研究人员发现不仅仅是在新生儿的尿液中, 在泌尿系统疾病的患者尿液中也可以培养出有增殖活性的祖细胞^[12]。2008 年, Zhang 等^[13] 首次采用富含 EGF 的角质细胞无血清培养基和胚胎纤维母细胞培养基的等比例混合液从人尿液中分离培养出干细胞, 命名为人尿源干细胞, 此类细胞贴壁生长, 具有克隆性, 可表达多数间充质干细胞和外周细胞标志物, 具备多向分化潜能, 经数代培养仍可保持核型稳定和无成瘤性等。有研究将人尿源干细胞和脂肪干细胞的第三代、第五代和第七代分别进行比较, 得出 hUSCs 具有更高的增殖能力、更强的集落形成能力、更高的干细胞标记物表达和更高的抑制免疫细胞活化效率^[14]。

对于 hUSCs 的来源, 科研人员进行了深入探究。Bharadwaj 等^[15] 研究发现 hUSCs 无法在骨髓间充质细胞培养体系生长, 且不表达尿道上皮细胞标志物, 说明 hUSCs 不是肾小管或尿道上皮漏出的细胞。该课题组还发现在接受男性供者肾移植的女性受者 hUSCs 中存在 Y 染色体, 并高表达肾系标志物 (包括 CD224、CD13、NR3C2、Pax2 和 Pax8) 以及肾脏层上皮细胞和壁层上皮细胞特异性标志物 (包括 CD146 和 podocin), 但不表达肾小管上皮细胞、输

尿管上皮细胞和尿道上皮细胞标志物^[1]。这项结果表明 hUSCs 来自于肾脏, 但具体来源于肾脏的哪个部位还有待研究。有文章总结了肾脱落在尿液中的细胞, 主要包括足细胞、近端小管上皮细胞、肾脏干细胞和细胞外囊泡^[2]。不少研究表明 hUSCs 具有很强的增殖能力和多向分化能力, 可作为组织工程中种子细胞的新来源^[13, 16-17]。当前 hUSCs 的培养方法还不完善, 得到的尿源干细胞纯度和质量相差很大, 因此对尿源干细胞的培养和鉴定需要进行更多探索。本研究通过简便高效的方法分离培养人尿源干细胞, 通过生长曲线测定和表面标志物检测来鉴定 hUSCs 的质量和纯度。由于 hUSCs 在组织工程和再生医学上具有重大潜能, 所以加深对 hUSCs 的认识, 建立简便高效的 hUSCs 分离和鉴定体系具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

经中国科学院动物研究所伦理委员会批准, 收集人的尿液用于分离培养人尿源干细胞。三名青年志愿者自愿签订《知情同意书》, 主动捐献尿液用于尿源干细胞的分离和培养。

主要试剂: DPBS、FBS、DMEM/F12、Trypsin-EDTA、Defined trypsin inhibitor 和 Pen/Strep 购自 Gibco 公司; 肾上皮细胞生长培养基 (REGM) 和 REGM Bullet kit 购自 Lonza 公司; Human CD34、CD45、CD44、CD73、CD90、CD34/CD90-isotype、CD45-isotype、CD44-isotype 和 CD73-isotype 抗体购自 BD Pharmingen 公司; Amphotericin B 购自上海翊圣生物有限公司; 成骨诱导培养基和成脂诱导培养基购自无锡菩禾生物医药技术有限公司。

主要设备: ESCO classII BSC 超净工作台 (Airstream 公司)、SERIES II WATER JACKET CO2 Incubator (Thermo Fisher 公司)、cence 湘仪离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司)、Olympus 倒置显微镜 (Olympus 公司)、FACSAriaII 流式细胞仪 (BD 公司)。主要耗材: 收集瓶, 细胞培养皿, 离心管和移液管等。

1.2 方法

1.2.1 尿液收集 首先, 建议志愿者在收集尿液前

2 h 喝水。接着,紫外照射收集室 30 min。向志愿者说明尿液收集的方法和注意事项,排好顺序,自行依次用对应的收集瓶进行收集。前段尿液约 20 mL 舍弃,收集中间段尿液,最后的少量尿液也舍弃。将收集瓶移入超净台中,用移液管将收集瓶中的尿液分装到 50 mL 离心管,每管 50 mL。先 $400 \times g$ 离心 6 min,接着用 20 mL PBS 洗一遍,最后向每个离心管中加入 3 mL Primary medium,轻轻重悬细胞。

1.2.2 培养基的配制 Primary medium 是在 DMEM/F12 基础培养基中加入 10% FPS、100 units/mL penicillin、100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin、the REGM SingleQuot kit supplements 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B。RE medium 是在 RE 基础培养基中加入 REGM Bullet kit。

1.2.3 尿源干细胞的原代培养 用 3 mL Primary medium 重悬细胞后,取铺有 0.1% 明胶的 12 孔板培养细胞。培养 4 d 时,用 RE medium 进行全量换液。用 RE medium 培养,每 2 d 换一次液。培养 12 d 时,细胞约长满整个孔面积。

1.2.4 尿源干细胞的传代培养 待细胞长满整个孔面积,进行细胞传代。首先用 PBS 洗一遍,接着用胰酶消化 3 min,其次用 1x Defined Trypsin inhibit 终止消化,收集细胞并计数,铺过 0.1% 明胶的六孔板每孔接种 1×10^5 个 hUSCs,标记为 P1,置于 37℃ 培养箱中培养。如上所述传于六孔板中,标记为 P2。待 P2 细胞长满后,消化和收集细胞并计数,按每皿 6×10^5 个 hUSCs 传入 100 mm 皿中,标记为 P3,之后用 100 mm 皿继续培养至第八代。

1.2.5 尿源干细胞的生长曲线 在铺过明胶的 24 孔板孔中分别加入 1 mL RE medium,接着分别接种 1 000 个 P2 代 hUSCs,每 2 d 换一次液。培养 2 d 后,收集两个孔的细胞,一起用血球计数板计数,测得细胞数的一半为 2 d 的细胞数目。在培养 4 d、6 d、8 d、10 d 后,同理测出相应的细胞数目。然后对 P6 代 hUSCs 进行生长曲线测定,分别测出在培养 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d 后对应的细胞数目。最后,重复两次 hUSCs 的生长曲线测定实验。整理 3 次实验结果,用 GraphPad Prism 软件做折线图。

1.2.6 尿源干细胞的核型鉴定 将 P6 代 hUSCs 培养 48 h 后,用含有秋水仙素终浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的培

养液处理 10 h。首先消化收集 hUSCs,用现配的 0.075 mol/L KCl 重悬细胞,置于 37℃ 处理 30 min。接着用现配且 4℃ 预冷的固定液(冰醋酸:甲醇=1:3)室温固定 30 min。然后用 4℃ 预冷的固定液再重复固定两次。接着取出在 -20℃ 预冷的干净载玻片,用 200 μL 移液枪悬于 1.5 m 高度进行滴片,并室温晾干。再用吉姆萨染液进行染色,染色 30 min 后漂洗并晾干。最后,用显微镜观察和拍照。

1.2.7 尿源干细胞的流式分析 收集 P2 代 hUSCs,用 PBS 洗 3 遍后,再用 PBS 重悬细胞并计数,调整细胞浓度为 1×10^7 cells/mL。取 18 个无菌无酶的 1.5 mL EP 管,各加入 100 μL 细胞悬液,分别加入相应的单克隆抗体 CD34-isotype, CD34, CD45-isotype, CD45, CD34-isotype+CD45-isotype, CD34+CD45, CD90-isotype, CD90, CD44-isotype, CD44, CD73-isotype, CD73, CD90-isotype +CD44-isotype, CD90+CD44, CD90-isotype + CD73-isotype, CD90 + CD73, CD90-isotype +CD44-isotype +CD73-isotype 和 CD90+CD44+CD73。充分混匀后,避光孵育 30 min。用 PBS 洗 3 遍,加入 250 μL PBS 重悬细胞,过滤网后用流式仪进行检测。同理,对 P6 代 hUSCs 进行流式检测。用 flowjo 进行数据分析。

1.2.8 尿源干细胞的成骨分化 取 P6 代 hUSCs,按照 1×10^5 cells/ cm^2 接种于铺过明胶的六孔板中,每孔加入 2 mL RE medium, 37℃, 5% CO_2 培养。待细胞融合度达到约 80%,弃去培养基,并小心沿壁加入 37℃ 预热的成骨诱导培养基。每隔 3 d 更换成骨诱导培养基。诱导 15 d 后,弃去诱导液,PBS 冲洗 3 遍,4% 多聚甲醛室温固定 30 min。弃去多聚甲醛,PBS 洗涤 3 遍,用 0.1% 的茜素红溶液染色 5 min,PBS 洗涤 3 遍,显微镜下观察结果并拍摄照片。

1.2.9 尿源干细胞的成脂分化 取 P6 代 hUSCs,按照 1×10^5 cells/ cm^2 接种在铺过明胶的六孔板中,每孔加入 2 mL RE medium, 37℃, 5% CO_2 培养。待细胞融合度达到约 80%,弃去培养基,并小心沿壁加入 37℃ 预热的成脂诱导培养基 A 液。诱导 2 d 后,换 37℃ 预热的成脂诱导培养基 B 液。诱导 1 d 后,换 A 液诱导。A 液和 B 液交替 4 次后,换 B 液维持培养至第 15 d。诱导 15 d 后,去掉诱导液,PBS 洗涤 3 遍,4% 多聚甲醛室温固定 30 min。弃去多聚甲

醛，PBS 洗涤 3 遍，经 3：2 稀释的油红 O 溶液染色 30 min，PBS 洗涤 3 遍，显微镜下观察结果并拍摄照片。

2 结果

2.1 人尿源干细胞的分离

在尿液收集时，需尿道口进行酒精消毒。如图 1 所示，由于每个人的饮食或体质不同，收集到的尿液颜色有所不同，在 50 mL 离心管中离心得到的沉淀量不太相同。同一个人的尿液在不同时间收集，离心得到的沉淀也有所不同，有时有较多白色沉淀，有时只有少量絮状沉淀。

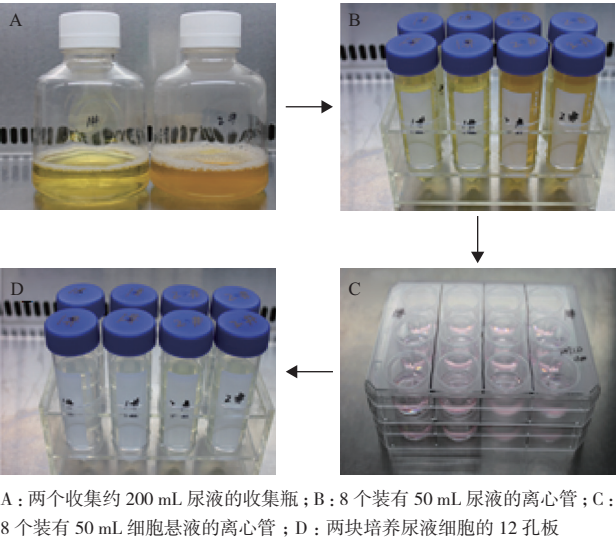


图 1 人尿源干细胞的分离

收集了 3 名志愿者不同时间点的尿液进行尿源干细胞的分离和培养。由表 1 可知，I 号和 II 号青年志愿者的 200 mL 尿液中含有大约 11 个尿源干细胞克隆，而 III 号志愿的 200 mL 尿液中含有大约 8 个尿源干细胞克隆；3 名志愿者都是 22 点收集的尿液中尿源干细胞克隆数多于 8 点和 14 点。因此为了一次性获得更多尿源干细胞，最佳收集尿液的时间是 22 点左右。

2.2 人尿源干细胞的原代培养

图 2-A 表示单个尿源干细胞克隆的生长情况，在倒置光学显微镜下观察培养 d2、d5、d8 和 d11 时的尿源干细胞生长状态。尿源干细胞接种约 36 h 贴

表 1 不同时间点的尿样中尿源干细胞克隆数比较

Volunteer	I	II	III
V ₁	200 mL	200 mL	150 mL
C ₁	8, 9, 6	8, 6, 5	5, 4, 3
V ₂	200 mL	150 mL	150 mL
C ₂	8, 9, 10	7, 6, 5	5, 4, 5
V ₃	200 mL	150 mL	200 mL
C ₃	12, 11, 12	9, 10, 10	8, 10, 7

注：分析 V₁ 表示 8 点（志愿者未进食时）收集的尿液体积，C₁ 表示 8 点收集的尿液中 hUSCs 的克隆数目；V₂ 表示 14 点（志愿者进食 2 h 后）收集的尿液体积，C₂ 表示 14 点收集的尿液中 hUSCs 的克隆数目；V₃ 表示 22 点（志愿者进食 4 h 后）收集的尿液体积，C₃ 表示 22 点收集的尿液中 hUSCs 的克隆数目

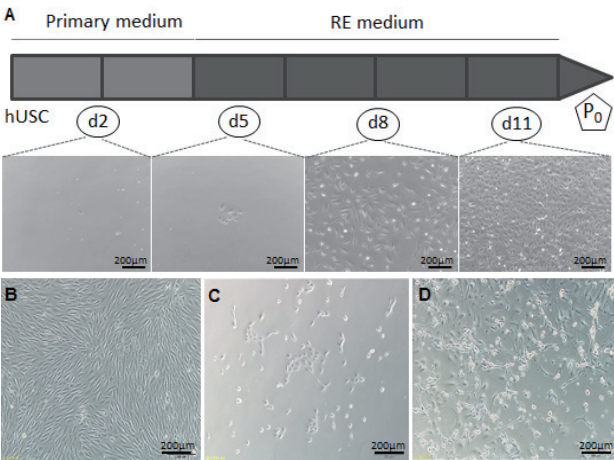
壁，呈圆形或梭形，有很好的折光性。4-5 d 后可明显看到放射状细胞集落，细胞胞浆丰富，胞核大，核仁清晰。培养约 12 d，细胞长满 12 孔板整个孔面积。在培养尿源干细胞时，观察到尿源干细胞克隆有 3 种形态，分别是纤维样、鹅卵石样和丝连样。其中纤维样和鹅卵石样尿源干细胞克隆在 3 名志愿者中都存在，而丝连样尿源干细胞克隆只在一名志愿中存在。如图 2-D 所示，丝连样尿源干细胞克隆的细胞之间以丝状相连，并有大量细胞突起生长和分裂。观察这 3 种形态的尿源干细胞克隆，得知纤维样细胞克隆形态更均一和分裂时间更短。

2.3 人尿源干细胞的传代培养与核型分析

如图 3-A 和 3-B 所示，观察到 P2 和 P6 代 hUSCs 的细胞形态均一、胞膜折光性强、胞浆丰富。比较 P2 和 P6 代 hUSCs，在传代培养过程中细胞形态未发生改变。取 P6 代 hUSCs 进行核型分析，经过吉姆萨染色后，观察到 P6 代尿源干细胞中依然含有 46 条染色体，说明传代过程中细胞核型能保持稳定（图 3-C）。

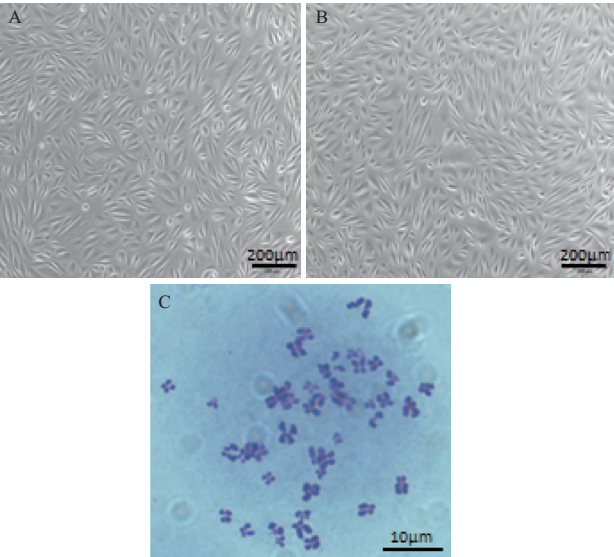
2.4 人尿源干细胞的生长曲线分析

由图 4 可知，在接种 0-2 d 细胞增殖缓慢，说明这段时间 hUSCs 处于调整期；在 2-8 d 生长曲线基本为线性，说明这段时间 hUSCs 处于对数生长期；在 8-10 d 细胞增殖逐渐变平缓，说明 hUSCs 处于平台期。比较 P2 和 P6 代 hUSCs 生长曲线，可知 P2 代 hUSCs 扩增能力明显大于 P6 代 hUSCs，说明培养过程中 hUSCs 的质量有所下降。因此，为了更好地进行 hUSCs 相关研究，建议采用 P6 代之前的 hUSCs



A : 原代培养 hUSC 克隆的生长观察 ; B : 原代培养 8 d 的纤维样克隆 ; C : 原代培养 8 d 的鹅卵石样克隆 ; D : 原代培养 8 d 的丝连状克隆

图 2 人尿源干细胞的原代培养



A : P2 代人尿源干细胞 ; B : P6 代人尿源干细胞 ; C : P6 代人尿源干细胞的核型

图 3 人尿源干细胞的传代培养与核型分析

进行其它研究。

2.5 人尿源干细胞的流式分析

尿源干细胞与间充质干细胞的生物学特征非常接近, 已有研究表明人尿源干细胞高表达 CD44、CD73 和 CD90 这 3 种标志物, 为此我们采用这 3 种标志物联合检测 hUSCs, 来判断 hUSCs 的纯度和质量。若表达这 3 种标志物的细胞数占总细胞数的百分比很高, 说明 hUSCs 的质量非常好。检测 CD44、

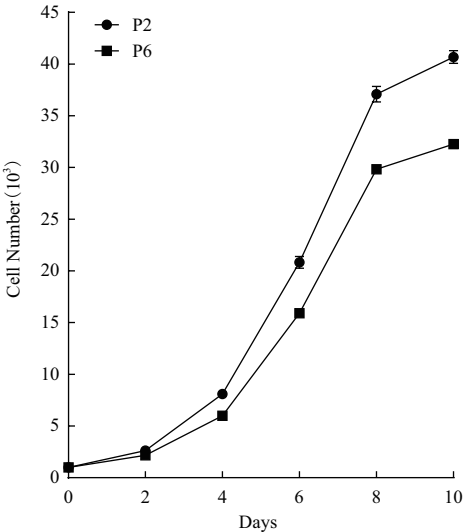


图 4 P2 和 P6 代人尿源干细胞的生长曲线

CD73 和 CD90 这 3 种标志物的同时, 我们也对这群细胞的血系细胞标志物 CD34 和 CD45 的表达情况进行了检测, 依此来区别于血系细胞。

收集 P2 代 hUSCs, 用流式检测人尿源干细胞抗原 CD34、CD45、CD44、CD73 和 CD90 的表达量。如图 5 所示, CD34 和 CD45 的阳性率分别为 0.226% 和 0.088%, 其中共表达 CD34 和 CD45 的 hUSCs 占 0.038%, 说明培养的 hUSCs 是非血系细胞。CD44 和 CD73 的阳性率分别为 99.60% 和 99.98%, 其中共表达 CD73 和 CD44 的 hUSCs 占 99.6%, 说明这些 hUSCs 的纯度和质量都比较好。然后分析 CD73 和 CD44 双阳性 hUSCs 的 CD90 表达情况, 得知所有细胞都表达抗原 CD90, 由此可知 P2 代 hUSCs 的纯度和质量都很好。

收集 P6 代 hUSCs, 用流式检测人尿源干细胞抗原 CD34、CD45、CD44、CD73 和 CD90 的表达量。如图 6 所示, CD34 和 CD45 的阳性率分别为 0.411% 和 0.150%, 其中共表达 CD34 和 CD45 的 hUSCs 占 0.025%, 说明我们分离到的细胞为非血系细胞。CD44 和 CD73 的阳性率分别为 99.67% 和 99.71%, 其中共表达 CD73 和 CD44 的 hUSCs 占 99.5%, 说明这些 hUSCs 的纯度和质量都比较好。然后分析 CD73 和 CD44 双阳性 hUSCs 的 CD90 表达情况, 得知在 CD73 和 CD44 双阳性 hUSCs 中有 95.3% 表达 CD90, 说明我们的培养系统比较稳定未引起 CD90 表达的

大量丢失。由此可知 P6 代 hUSCs 与 P2 代相比，从 CD34、CD45、CD44、CD73 和 CD90 的表达情况综合来看 hUSCs 的纯度和质量未有显著变化。

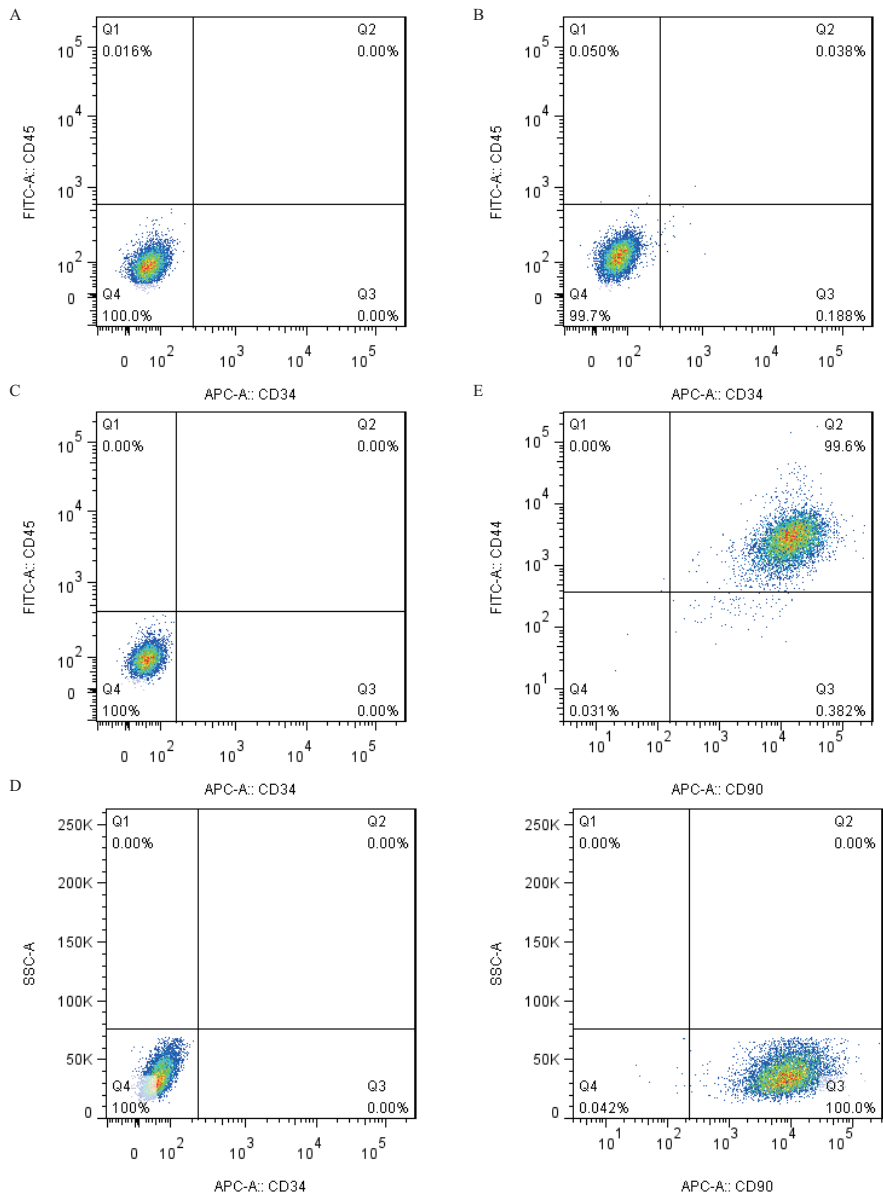
2.6 成骨和成脂诱导培养基诱导hUSCs分化

如图 7-A 和 7-B 所示，P6 代 hUSCs 在成骨细胞诱导培养基中诱导 15 d 后，开始出现钙质结节，用 0.1% 茜素红染色，矿化结节呈现红色，表明有钙盐形成，说明细胞具有成骨分化的潜能。如图 7-C 和

7-D 所示，P6 代 hUSCs 在成脂细胞诱导培养基中诱导 15 d 后，少量细胞浆内可见圆形透亮脂滴，油红 O 染色可见部分细胞内红色脂滴。通过成骨和成脂分化，得知 hUSCs 具有向骨细胞和脂肪细胞的分化潜能。

3 讨论

尿源干细胞是从尿液中分离培养出来的具有良好增殖活性和多向分化能力的成体干细胞，研究表



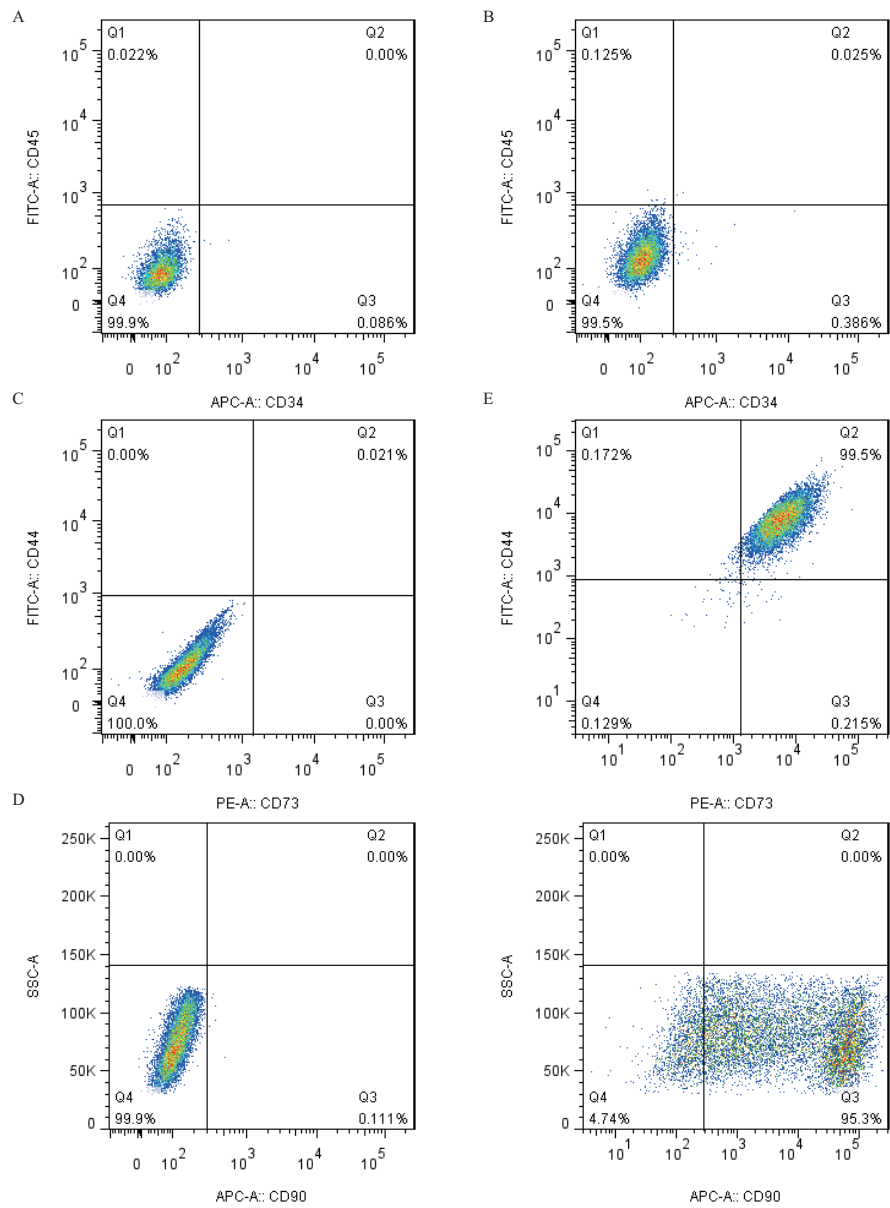
A 和 B：hUSCs 的 CD34 和 CD45 表达分析；C、D 和 E：hUSCs 的 CD44、CD73 和 CD90 表达分析

图 5 第二代人尿源干细胞表面标志物的表达

明其特性和间充质干细胞类似^[18-20]。由于hUSCs 收样方便、操作无创、培养稳定、无致瘤性、自我更新和分化能力强等优点，hUSCs 成为了组织工程和再生医学研究领域的新热点，具有广阔的应用前景。人们对于hUSCs 的研究尚处于起步阶段，近期有研究表明供体年龄对hUSCs 的增殖、衰老和软骨分化能力等有影响，指出儿童尿液分离出的hUSCs 克隆数比中年人和老年人多，而且有更强的扩增能力^[16]。

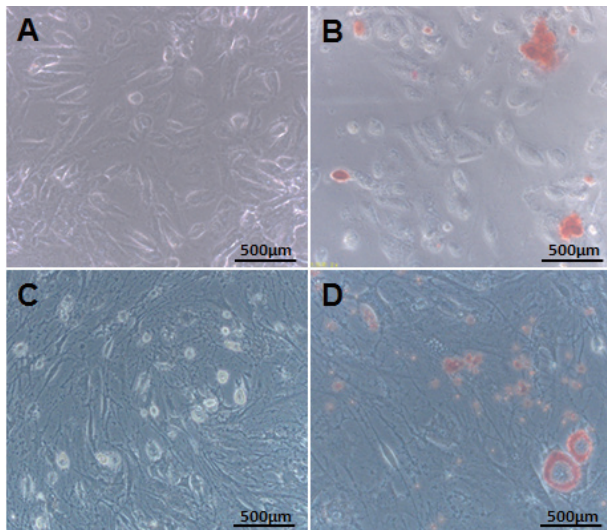
本研究以青年志愿者的尿液为材料，分离培养人尿源干细胞，并进行分析和鉴定，成功建立了人尿源干细胞的分离和鉴定体系。

对于尿源干细胞的鉴定，主要有3种方法：细胞形态学观察、流式检测表面标志物、成骨成脂等诱导分化。从细胞的生长情况来看，我们分离的尿源干细胞从单细胞培养12 d后，长满12孔板整个孔面积。从细胞形态来看，尿源干细胞克隆具有纤



A 和 B : hUSCs 的 CD34 和 CD45 表达分析 ; C、D 和 E : hUSCs 的 CD44、CD73 和 CD90 表达分析

图 6 第六代人尿源干细胞表面标志物的表达



A : 成骨诱导 15 d 的 hUSCs ; B : 茜素红染色成骨诱导 15 d 的 hUSCs ; C : 成脂诱导 15 d 的 hUSCs ; D : 油红 O 染色成脂诱导 15 d 的 hUSCs

图 7 第六代人尿源干细胞成骨和成脂分化

维样、鹅卵石样和丝连样等 3 种形态，这与许多文章的观察结果相似^[8]。从传代培养来看，第六代尿源干细胞的细胞状态依然很好，可作为科学研究良好的种子细胞。从扩增曲线来看，P2 和 P6 代 hUSCs 的扩增能力有一定差异，说明传代次数的增加，hUSCs 的增殖能力有一定下降，因此建议在研究尿道上皮细胞^[22]、尿道平滑肌细胞^[23]、骨骼肌细胞^[1]、神经细胞^[24]和内皮细胞^[25]等分化时尽量使用前六代 hUSCs。目前，在 hUSCs 的流式分析和鉴定上还没有较好的标准，本文采用阴性标记和阳性标记相结合的方法进行鉴定，并通过 hUSCs 三种表面标志物 CD44、CD73 和 CD90 的表达情况来综合判断分离培养 hUSCs 的质量和纯度^[2, 9, 16]。由流式检测结果得知，在前 6 代中共表达 CD44 和 CD73 的 hUSCs 阳性率都保持 99% 以上，但是在传代培养中 hUSCs 抗原 CD90 的表达量有所降低，因此我们提出可以以 CD90 的表达情况作为 hUSCs 培养过程的监测。

由于 hUSCs 具有获取简单、可多次获取、来源丰富、无创伤、无伦理问题、生长增殖能力强、自我更新能力高、多向分化能力强、免疫原性低等优点，因此被认为是组织工程良好的种子细胞^[26-27]。在不同的诱导方法作用下，hUSCs 可以分化为成骨

细胞、软骨细胞、脂肪细胞、尿路上皮细胞、平滑肌细胞及神经细胞等多种组织类型的细胞，不但在组织器官修复重建及疾病治疗等领域有良好的应用前景，在药物活性及毒性替代筛选方面也有很大的潜力。虽然 hUSCs 具有众多优点和重大前景，但要真正走向临床还有很多问题需要解决，例如 hUSCs 来源的进一步明确、hUSCs 质量鉴定标准的确立、hUSCs 培养及鉴定方法的优化、hUSC 重编程为 iPSC 效率的提高、选择合适的支架材料、体内长期安全性、分化获得的细胞能否在机体发挥功能、体外重建的器官能否在体内行使功能等，这些都有待于更多的体外实验和体内验证。

4 结论

通过收集青年志愿者的尿液来分离培养人尿源干细胞，发现人尿源干细胞克隆有纤维样、鹅卵石样和丝连样等 3 种形态。前 6 代 hUSCs 培养中细胞形态未发生改变，但从生长曲线测定结果可知 hUSCs 的扩增能力有很大下降。在前 6 代 hUSCs 中抗原 CD44 和 CD73 的表达量相对稳定，而抗原 CD90 的表达量有所下降，可根据 CD90 的表达情况来判断 hUSCs 的质量。经核型分析，P6 代 hUSCs 的核型保持稳定。经成骨和成脂诱导，P6 代 hUSCs 可分化为骨细胞和脂肪细胞。本研究初步建立了简便高效的 hUSCs 培养和鉴定体系，为疾病治疗、组织再生和器官重建等提供了可靠的细胞来源。

参考文献

- [1] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells : potential for therapeutic applications in urology [J]. *Stem Cells*, 2013, 31 (9) : 1840-1856.
- [2] Zhang D, Wei G, Li P, et al. Urine-derived stem cells : A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine [J]. *Genes Dis*, 2014, 1 (1) : 8-17.
- [3] Lazzeri E, Ronconi E, Angelotti ML, et al. Human urine-derived renal progenitors for personalized modeling of genetic kidney disorders [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26 (8) : 1961-1974.
- [4] Guan J, Zhang J, Li H, et al. Human urine derived stem cells in combination with β -TCP can be applied for bone regeneration [J].

- PLoS One, 2015, 10 (5) : e0125253.
- [5] Guan J, Zhang J, Guo S, et al. Human urine-derived stem cells can be induced into osteogenic lineage by silicate bioceramics via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J] . *Biomaterials*, 2015, 55 : 1-11.
- [6] Wu S, Wang Z, Bharadwaj S, et al. Implantation of autologous urine derived stem cells expressing vascular endothelial growth factor for potential use in genitourinary reconstruction [J] . *J Urol*, 2011, 186 (2) : 640-647.
- [7] Afzal MZ, Gartz M, Klyachko EA, et al. Generation of human iPSCs from urine derived cells of a non-affected control subject [J] . *Stem Cell Res*, 2017, 18 : 33-36.
- [8] Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J] . *Nat Protoc*, 2012, 7 (12) : 2080-2089.
- [9] Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction [J] . *J Urol*, 2008, 180 (5) : 2226-2233.
- [10] Sutherland GR, Bain AD. Culture of cells from the urine of newborn children [J] . *Nature*, 1972, 239 (5369) : 231.
- [11] Dörrenhaus A, Müller JI, Golka K, et al. Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system [J] . *Arch Toxicol*, 2000, 74 (10) : 618-626.
- [12] Racusen LC, Fivush BA, Andersson H, et al. Culture of renal tubular cells from the urine of patients with nephropathic cystinosis [J] . *J Am Soc Nephrol*, 1991, 1 (8) : 1028-1033.
- [13] Oliveira Arcolino F, Tort Piella A, Papadimitriou E, et al. Human urine as a noninvasive source of kidney cells [J] . *Stem Cells Int*, 2015, 2015 : 362562.
- [14] Kang HS, Choi SH, Kim BS, et al. Advanced properties of urine derived stem cells compared to adipose tissue derived stem cells in terms of cell proliferation, immune modulation and multi differentiation [J] . *J Korean Med Sci*, 2016, 30 (12) : 1764-1776.
- [15] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering [J] . *Tissue Eng Part A*, 2011, 17 (15-16) : 2123-2132.
- [16] Qin D, Long T, Deng J, et al. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair [J] . *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5 (3) : 69.
- [17] Schosserer M, Reynoso R, Wally V, et al. Urine is a novel source of autologous mesenchymal stem cells for patients with epidermolysis bullosa [J] . *BMC Res Notes*, 2015, 8 : 767.
- [18] Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells [J] . *Methods Mol Med*, 2007, 140 : 67-81.
- [19] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J] . *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (9) : 726-736.
- [20] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells [J] . *Cell Transplant*, 2011, 20 (1) : 5-14.
- [21] Gao P, Han P, Jiang D, et al. Effects of the donor age on proliferation, senescence and osteogenic capacity of human urine-derived stem cells [J] . *Cytotechnology*, 2017, 69 (5) : 751-763.
- [22] Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells : lessons from the skeletal muscle satellite cell [J] . *Cell Stem Cell*, 2012, 10 (5) : 504-514.
- [23] Guan J, Niu X, Gong F, et al. Biological characteristics of human Urine derived Stem Cells : potential for cell-based therapy in neurology [J] . *Tissue Eng Part A*, 2014, 20 (13-14) : 1794-1806.
- [24] Zhang SZ, Ma LX, Qian WJ, et al. Modeling Neurological Disease by rapid conversion of human urine cells into functional neurons [J] . *Stem Cells Int*, 2016 : 2452985.
- [25] Liu G, Wang X, Sun X, et al. The effect of urine-derived stem cells expressing VEGF loaded in collagen hydrogels on myogenesis and innervation following after subcutaneous implantation in nude mice [J] . *Biomaterials*, 2013, 34 (34) : 8617-8629.
- [26] Chun SY, Kim HT, Lee JS, et al. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer [J] . *Urology*, 2012, 79 (5) : 1186. e1-7.
- [27] Gao P, Jiang DP, Liu WJ, et al. Urine-derived stem cells, a new source of seed cells for tissue engineering [J] . *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11 (7) : 547-553.

(责任编辑 李楠)