

综 述



杨莉，2001年毕业于北京大学医学部，获医学博士学位，2007~2010年美国哈佛医学院访问学者，现任北京大学第一医院主任医师、教授、博士生导师，科研副院长、肾内科主任。中华医学会常务理事、亚太地区肾脏病学会急性肾损伤专业委员会副主席、世界中医药联合会临床用药安全研究专委会副会长、国际急性肾损伤 ADQI 专家共识组专家。获评中国青年科技奖特别奖、中国青年女科学家奖、中华肾脏病学会青年研究者奖等。获评国家卫生健康突出贡献中青年专家。长期从事急性肾损伤的临床防治与发病机制研究，主持国家自然科学基金杰出青年科学基金、国家自然科学基金重点项目、北京市高校卓越青年科学家专项等。在急性肾损伤领域发表 SCI 论文 70 余篇，包括 *Lancet*、*Nat Med*、*J Clin Invest*、*Adv Sci*、*J Am Soc Nephrol* 等。

人羊膜上皮细胞的临床应用潜力的研究进展

姬 静¹，杨 莉^{1,2,3,*}

¹北京大学第一医院肾内科，北京大学肾脏疾病研究所；²中国卫生部肾脏病重点实验室；³中国教育部慢性肾脏病防治重点实验室(北京大学)，北京 100034

摘 要：人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)是位于胎盘羊膜靠近胎儿侧的上皮细胞，与其他胎盘来源的干细胞不同，hAECs源自胚胎上胚层，被认为是再生医学的理想种子细胞类型。研究显示，hAECs兼具胚胎干细胞样增殖分化潜力和成体干细胞样免疫调节特性。与其他类型的干细胞相比，hAECs在临床应用上具有特殊的优势，包括易于分离、细胞数量多、移植后无致瘤性和不涉及伦理问题等。在过去的二十年中，大量基础和临床前研究证明了hAECs具有治疗多种疾病的潜力。越来越多的证据表明，hAECs可通过不同的分子机制来修复甚至重建受损组织和器官的功能。本文详细综述了hAECs的主要生物学特征，总结了hAECs的研究现状，并讨论了基于hAECs的细胞疗法的临床应用前景。

关键词：人羊膜上皮细胞；细胞治疗；旁分泌作用；免疫调节；再生医学

Advances on human amniotic epithelial cells and its clinical application potential

Ji Jing¹, Yang Li^{1,2,3,*}

¹Renal Division, Department of Medicine, Peking University First Hospital, Institute of Nephrology, Peking University; ²Key Laboratory of Renal Disease, Ministry of Health of China; ³Key Laboratory of Chronic Kidney Disease Prevention and Treatment (Peking University), Ministry of Education of China, Beijing 100034, China

Abstract: Human amniotic epithelial cells (hAECs) are epithelial cells located on the placental amnion near the fetus. Different from other placental-derived stem cells, hAECs are derived from embryonic epiblast, and have been considered as seed cells for regenerative medicine. hAECs possess embryonic stem cell-like multi-differentiation capabilities and adult stem cell-like immunomodulatory properties. Compared with other types of stem cells, special properties of hAECs make them unique, including easy isolation, abundant cell numbers, non-tumorigenicity after transplantation, and the obviation of ethical debates. During the past two decades, the therapeutic potential of hAECs has been extensively investigated in various diseases. Accumulating evidence has demonstrated that hAECs

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91742205 and 81625004) and the Beijing Young Scientist Program (No. BJJWZYJH01201910001006).

*Corresponding author. Tel: +86-10-83572211; E-mail: li.yang@bjmu.edu.cn

contribute to repairing and remodeling the function of damaged tissues and organs through different molecular mechanisms. This article provides an in-depth review of the biological characteristics of hAECs, summarizes the research status of hAECs, and discusses the clinical application prospects of hAEC-based cell therapy.

Key words: human amniotic epithelial cell; cell therapy; paracrine effect; immunomodulation; regenerative medicine

基于干细胞的细胞治疗为许多难治性疾病带来了希望^[1]。近年来,围产期干细胞因其不同于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的独特优势成为医学研究和临床试验的热点,已被认为是同种异体疗法中最理想的干细胞来源之一^[2]。人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)源自最接近胎儿的胎盘最内层,由胚胎内细胞团分化发育而成^[3]。hAECs作为围产期干细胞的一种,兼具ESCs和成体干细胞的双重特性(多能性和免疫调节能力)^[4]。目前,hAECs已广泛用于多种疾病的临床前研究,包括中枢神经系统损伤与疾病^[5]、糖尿病^[6]、肝损伤^[7,8]、肺损伤^[9,10]、急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)^[11,12]、卵巢损伤^[13]、角膜损伤^[14]和肿瘤^[15]等,均体现出良好的治疗效果和安全性。在本综述中,我们详尽描述了hAECs的起源和生物学特征,总结了迄今为止关于hAECs的基础研究、临床前研究和临床试验,并基于这些研究结果提出了hAECs的应用前景和可能面临的挑战。

1 hAECs概述

1.1 hAECs的来源

人羊膜是附着在胎盘胎儿面的半透明无血管薄膜,由5层结构组成:上皮层、基底膜、致密层、纤维母细胞层和海绵层(后三层统称为基质层)^[16],内含两种细胞类型,即hAECs和人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs),本综述只涉及hAECs的研究。与其他胎盘成分不同,hAECs来源于多能上胚层,在受精后8~9天由胚胎内细胞团发育而来^[3,17]。在囊胚植入子宫内膜间质后,内细胞团分化为2层:上胚层和下胚层。上胚层是3个胚层的起源,最终将分化为胚胎^[17]。随后,内细胞团和邻近滋养层细胞之间逐渐形成一空腔,即羊膜腔^[18-20]。位于羊膜腔内的细胞被称为羊膜母细胞,即hAECs的前体细胞。羊膜母细胞的形成发生于决定细胞命运的原肠胚形成之前,提示hAECs具有多能性^[21]。

1.2 hAECs的分离与培养

获得高质量的hAECs是临床应用的前提。早在1981年起,Akle等人^[22]便开始尝试从足月胎盘分离hAECs并进行体外培养。目前,已开发了多种hAECs分离和培养的方案,但不同方案所获得的细胞产量、活力和纯度有所不同,这与母体自身因素(如年龄、孕周、分娩类型)、胎盘的大小和质量、运输条件、细胞消化的方式、浓度和时间等有关^[23-25]。Miki等人^[23]采用三步消化法从羊膜分离hAECs,并在标准培养基中加入胎牛血清、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸等对其进行培养,在存在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的情况下,培养的hAECs具有典型的鹅卵石样上皮表型。Motedayyen等人^[26]建立了一种改良方案,获得了高产量、高纯度和高活力的hAECs,并极大地减少了分离过程中来自胎盘其他细胞的污染。据统计,此种方法可获得约 1.9×10^8 个细胞,平均细胞活力约87%,这为临床使用提供了充足的细胞供应。然而,上述的分离培养方法中均使用了胎牛血清以促进细胞的快速生长和增殖,但动物血清的临床实用性很差。一些实验室借助血清替代物开发了hAECs的无血清分离和培养系统,发现与传统的含血清培养基相比,hAECs在替代血清培养基中生长得更好,其干性和免疫调节能力最长可维持4代,并且经过冻存的hAECs再培养后也显示出良好的上皮形态^[27,28]。

1.3 hAECs的生物学特性

与其他用于细胞治疗的干细胞相比,hAECs具有如下生物学特性,使之成为再生医学领域最具临床应用潜力的种子细胞:(1)hAECs具有多能性,可以分化为3个胚层的细胞^[21];(2)hAECs免疫原性低,可分泌多种免疫调节因子,移植后不易产生免疫排斥反应^[29];(3)hAECs富含溶酶体,可参与自噬的活化^[30];(4)hAECs缺乏端粒酶,无致瘤性,遗传稳定,临床应用具有安全性^[31];(5)hAECs的来源物——胎盘通常在分娩后作为医疗废弃物丢弃,容易获得,不涉及伦理问题;(6)一个足月胎盘可获得约 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个hAECs,无需扩增即

可获得足够数量的细胞；(7) hAECs 是新生细胞，没有时间、年龄或环境相关的 DNA 损伤。

2 hAECs 基础研究进展

2.1 hAECs 的干细胞特征

hAECs 的出现早于原肠胚的形成，因此，hAECs 在一定程度上可以保留原肠胚形成前期胚胎细胞的分化可塑性^[32]。2005 年，Miki 等人^[21]对 hAECs 的干细胞特性进行了详细描述：hAECs 表达 ESCs 特异性表面抗原，包括阶段特异性胚胎抗原 (stage-specific embryonic antigen, SSEA)-3、SSEA-4、肿瘤排斥抗原 1 (tumor rejection antigen 1, TRA1)-60 和 TRA1-81，但 hAECs 不表达 SSEA-1。尽管这些干细胞标记会随着妊娠的进展而逐渐消失，但某些 hAECs 在足月时仍保留这些标记^[33]。此外，干细胞标记物分析显示 hAECs 具有异质性：最严格的干细胞标记 Nanog 仅在 1%~3% 的 hAECs 上表达，而大约 50% 的 hAECs 在足月时仍保持 SSEA-4 阳性^[34]。Bryzek 等人^[35]发现，只有约 4% 的 hAECs 共表达 SSEA-4、TRA1-60 和 TRA1-81 抗原。来自羊膜不同区域的 hAECs 其多能干细胞标记和增殖能力也有差异^[36]。hAECs 还表达多能干细胞特异性转录因子，包括八聚体结合蛋白 4 (octamer-binding protein 4, Oct-4)、Nanog、Sox-2、Lefty-A、成纤维细胞生长因子 4 (fibroblast growth factor 4, FGF-4)、Rex-1、CFC-1、DPPA-3 和 TDGF-1^[2]。这些研究表明，足月羊膜上皮在不同发育阶段具有不同的基因表达谱和不同程度的干性。

在适当的培养条件下，hAECs 表现出极高的分化可塑性，具有分化为 3 个胚层的能力。即使是干细胞标记阴性的 hAECs，也可以在体外被诱导进行特异性分化^[9, 37]。hAECs 可以：(1) 分化为外胚层：研究显示，部分新鲜分离的 hAECs 表达神经细胞标记和神经胶质细胞标记^[38]；在病理情况 [(脑水肿、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI)] 下，移植的 hAECs 能够分化为 MAP2 阳性神经元样细胞^[32]；(2) 分化为中胚层：添加抗坏血酸可在体外诱导 hAECs 表达心脏特异性基因和转录因子 MLC-2、GATA-2 和 Nkx2.5^[21]；在适当的培养条件下，hAECs 还能分化为其他中胚层细胞谱系，例如脂肪细胞和骨细胞^[37]；(3) 分化为内胚层：主要涉及肝脏和胰腺谱系。hAECs 在含有烟酰胺的无血清培养环境中可表达与胰腺发育相关的基

因 (如 Pdx1、Pax6 和 Nkx2.2)，并具有分泌胰岛素和胰高血糖素的能力^[39]。Liu 等人^[7]在体外将 hAECs 诱导分化为肝细胞样细胞，将诱导的细胞移植入四氯化碳诱导的急性肝衰竭小鼠后，小鼠的肝功能和存活率均得到了显著改善。移植的 hAECs 可整合到宿主肝脏并分化为肝细胞样细胞，分化的 hAECs 表达的肝细胞标志物与胎儿肝细胞标志物表达水平相当^[8, 40]。此外，hAECs 还可以分化为胆管细胞^[41]和肺上皮细胞^[9]，这可能为胆汁淤积性导管增生和肺纤维化提供新的治疗选择。

2.2 hAECs 的免疫学特性

像多数胎盘来源的细胞一样，hAECs 具有免疫豁免的优势。hAECs 具有间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 样表型，表达细胞表面标记 CD10、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD117 和 CD166，但不表达 CD14、CD34、CD45、CD79 和人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-DR，提示 hAECs 具有与 MSCs 相似的低免疫原性和免疫调节特性^[4, 42]。Akle 等人^[22]发现，将免疫类型不匹配的 hAECs 移植到志愿者皮下不会引发宿主免疫反应，这可能与 hAECs 不表达多态性抗原 HLA-A、HLA-B、HLA-D 和 HLA-DR 有关。hAECs 表达与免疫耐受相关的非多态性、非经典 HLA-G 和 HLA-E^[29, 43]，故移植的 hAECs 不会引起强烈的免疫排斥反应。在存在或不存在炎症刺激因子的情况下，hAECs 既不表达 T 淋巴细胞共刺激分子 CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40 或 CD40 配体，也不表达程序性细胞死亡受体 1 (programmed cell death receptor 1, PD1) 及其配体，这些研究均提示 hAECs 可诱导免疫耐受^[44]。

hAECs 可分泌多种免疫调节因子，发挥成体干细胞的免疫调节作用。hAECs 释放的免疫抑制分子包括白细胞介素 1 (interleukin 1, IL-1) 受体拮抗蛋白、金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)、巨噬细胞迁移抑制因子 (migration inhibitory factor, MIF)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、胰岛素样生长因子 II (insulin-like growth factor II, IGF-II)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 等^[29, 45, 46]。这些可溶性细胞因子通过抑制自然杀伤细胞 (natural killer,

NK) 的活化而阻断 NK 细胞毒性, 抑制中性粒细胞、树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和巨噬细胞的趋化活性, 促进巨噬细胞表型转化等调节先天免疫和免疫耐受^[47-49]。除了下调先天免疫应答, hAECs 对适应性免疫也具有调节作用。hAECs 表达免疫抑制分子 Fas (CD59) 和 Fas 配体, 调节补体免疫系统, 并参与诱导 T 淋巴细胞凋亡^[50]。已经证明, hAECs 以剂量依赖性方式抑制 T 细胞增殖, 促使 T 细胞向调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 极化, 改变 T 细胞不同亚群的相对比例, 通过加强对适应性免疫的调节, 抑制同种异体或其他相关免疫反应^[49-51]。

2.3 hAECs 的归巢与分化

细胞迁移、归巢和分化是评估干细胞疗效的主要方面。移植的 hAECs 可迁移到受损组织, 并在特定条件下进一步分化为相应的细胞类型参与受损组织的功能恢复。研究显示, 在缺血性脑卒中大鼠模型中, 移植的 hAECs 可迁移到缺血区域并表达神经元特异性标志物 MAP2 和神经元祖细胞标志物 Nestin, 改善大鼠的行为功能障碍, 并减少梗死面积^[52]。Hodges 等研究显示, 移植的 hAECs 可分化为 I 型和 II 型肺泡细胞, 减轻通气诱导的早产肺损伤^[53]。尽管越来越多的体外和体内研究证实 hAECs 可被诱导分化为所需的细胞类型, 但是现有的证据不足以说明移植的 hAECs 是否长期整合到靶器官中。Srinivasan 等人^[54]通过不同的给药途径观察移植的 hAECs 归巢到受损器官的能力, 发现经尾静脉注射的细胞大多数聚集于肺脏, 并在短时间内被清除; 而定点移植的细胞几乎均停留在输注部位, 并可长期在体内存活。Luo 等人^[55]进一步观察到, 仅有极少量的 hAECs 可以归巢到受损靶器官, 但这部分归巢的细胞并不能分化为相应的细胞类型, 提示 hAECs 的治疗效果可能并不是通过归巢与分化实现的。尽管有学者提出 hAECs 可能通过转分化为卵巢颗粒细胞而加速化疗后卵巢损伤的功能恢复, 但概率很小^[13]。本研究组的研究进一步验证了上述发现, 在 AKI 小鼠模型中, hAECs 注射后与肾组织的整合程度非常低^[12]。归巢效率有限可能与移植的细胞数量、输注途径和移植后细胞的生物分布有关, 缺乏长期且稳定的移植细胞追踪方法也使得对分化的细胞功能研究尚不完善。

2.4 hAECs 的旁分泌作用

旁分泌功能已被认为是 hAECs 介导功能恢复和免疫调节的主要潜在机制。越来越多的证据表明,

hAECs 可通过分泌生物活性细胞因子和微囊泡 (microvesicles, MVs) 为受损细胞提供有益修复的微环境, 并激活受损组织的内源性再生机制。有证据表明, 注射 hAECs 来源的条件培养基 (conditioned medium, CM) 具有与移植 hAECs 相类似的效果^[56], 这为我们提供了一种新的无干细胞生物疗法的可替代方案。hAECs 分泌多种细胞因子、生长因子、趋化因子、细胞黏附分子和 MVs/ 外泌体 (exosomes, Exos), 可发挥促进细胞增殖、迁移、去分化、血管生成、抗炎、抗氧化、抗纤维化和抗凋亡等诸多作用^[44, 57, 58]。这些细胞因子在各种疾病模型中的治疗作用已得到研究和证实^[56]。

免疫成分在驱动组织修复和损伤中发挥重要作用。hAECs 的免疫调节作用主要是通过分泌多种免疫抑制分子实现的。例如, hAECs 分泌的 MIF 可抑制中性粒细胞和巨噬细胞的迁移^[50]。hAECs 可通过自分泌或诱导其他免疫细胞分泌 IL-10 而抑制 T 细胞增殖, 影响 T 细胞和 NK 细胞的活性^[49]。PGE2 是 hAECs 分泌的一种具有免疫抑制作用的免疫调节介质, 它可以调节趋化因子的产生并减少炎性细胞的迁移^[4, 59]。

除免疫抑制因子外, hAECs 还能分泌多种生长因子、营养因子和血管生成相关因子, 包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、EGF、肝素结合 EGF 样生长因子 (heparin binding EGF like growth factor, HB-EGF)、血小板衍生生长因子亚单位 B (platelet derived growth factor subunit B, PDGFB)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管生成素 (angiogenin, ANG)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGF) 和胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding proteins, IGFBPs)^[60]。这些因子具有促进细胞迁移、增殖和血管生成的作用。但是, 不同来源 (足月和早产) 的 hAECs 促进血管生成的能力不同^[61]。炎症的存在会抑制 hAECs 的血管生成作用, 而低氧可促进 hAECs 分泌促血管生成因子并加速心肌组织再生^[62]。

hAECs 具有抗纤维化的特性。hAECs 分泌 EGF、PDGF 和 FGF, 通过调节相应的信号通路发挥抗纤维化作用^[63]。hAECs 分泌的 HLA-G 可通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)/Smad3 依赖性途径, 减少成纤维细胞的胶原生成而抑制纤维化^[64]。Zhang 等人^[13]发现 hAECs

以旁分泌的方式分泌 TGF- β 1、生长分化因子 9 (growth differentiation factor, GDF9) 和骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15), 激活 TGF- β /Smad3 通路, 进而抑制化疗诱导的细胞凋亡和纤维化。hAECs 还可通过分泌基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 和 MMP-9 来促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑, 延缓纤维化疾病的进展^[65]。

细胞衰老是指不可逆的细胞增殖停滞, 伴随染色质、基因转录和蛋白质分泌的相关变化^[66]。研究显示, hAEC-CM 可延缓氧化应激诱导的人皮肤成纤维细胞衰老, 这一过程是通过减少细胞内活性氧的产生, 降低衰老相关 β -半乳糖苷酶活性和下调衰老相关蛋白 p21、p16 的表达, 促进细胞进入 S 期而实现的^[67]。Di Germanio 等人^[68]使用大鼠 AEC 来源的 CM 与人成纤维细胞共培养, 也发现了衰老相关分泌表型的显著降低。

在干细胞治疗领域, MVs/Exos 作为旁分泌信号的重要载体日渐引起了人们的关注。几乎所有的活细胞都可以分泌 MVs/Exos, 通过运输多种生物活性物质参与细胞间通讯, 在生理和病理过程中发挥多种生物学功能^[69]。大量的临床前研究确证了 hAECs 来源的 MVs/Exos 在限制损伤和增强修复方面的能力, 例如促进伤口愈合^[70], 减轻特发性肺纤维化^[71]和卵巢早衰^[72]。hAEC 来源的 Exos (hAEC-Exos) 通过促进皮肤成纤维细胞的迁移和增殖, 加速胶原纤维的形成而促进皮肤的伤口愈合^[73]。综上, hAEC-Exos 作为细胞间通讯的新媒介在干细胞治疗中具有重要的应用潜力, 进一步探索并鉴定最有效的分泌组分将为再生医学开辟新的方向。

3 hAECs临床前研究进展

3.1 组织纤维化

纤维化是指由于炎症导致器官实质细胞发生坏死, 组织内 ECM 异常增多和过度沉积的病理过程。组织纤维化是许多疾病致残、致死的主要原因。已经证明, hAECs 可以减轻组织纤维化, 包括肝纤维化^[65, 74–77]、肺纤维化^[9, 10, 71]、宫腔粘连^[78, 79]和心肌纤维化^[80]。

肝纤维化是慢性肝脏病的常见后果, 临床治疗效果不佳。已经证明, hAECs 在多种肝纤维化模型中具有疗效。hAECs 和 hAEC-CM 通过抑制 pSMAD2/3 信号传导, 减少 ECM 沉积, 显著减轻非酒精性脂

肪肝的肝脏炎症和纤维化^[74]。在四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型中, hAECs 和 hAEC-Exos 可促进肝祖细胞增殖, 减少肝细胞凋亡, 调节巨噬细胞极化, 并减少其浸润来减轻肝脏炎症反应^[76, 81, 82]。

博来霉素诱导的小鼠肺损伤模型是经典的慢性肺纤维化模型。Moodley 等人^[9]发现, hAECs 可能通过分泌 TIMP-1、TIMP-2 降低肺组织中胶原蛋白的含量, 减轻肺部炎症, 促进 ECM 重塑并抑制肺纤维化。Tan 等人^[71]则进一步证明了 hAEC-Exos 在肺纤维化中同样具有限制损伤并促进内源性修复的作用; hAEC-Exos 可促进巨噬细胞极化并增强巨噬细胞吞噬作用, 抑制中性粒细胞髓过氧化物酶活性并直接影响 T 细胞增殖。

宫腔粘连是妇科的一种难治性纤维化疾病。Bai 等人^[79]利用机械创伤构建了大鼠宫腔粘连模型, 发现在给予 hAECs 后子宫内膜增生和胶原沉积明显减少, 新生血管生成增多。此外, hAECs 可分泌具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤特性的异鼠李素 (isorhamnetin, ISO), ISO 通过抑制促纤维化因子 TGF- β 和 I 型胶原蛋白 1 α 的表达, 促进心肌纤维化小鼠心肌组织重塑并抑制心肌肥大和纤维化^[80]。

总的来说, hAECs 一方面通过调节巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞、DC 和某些细胞因子来发挥抗炎和抗纤维化作用。另一方面, hAECs 通过抑制纤维化相关信号通路——TGF- β 信号通路的激活, 起到限制损伤的作用。

3.2 肾脏损伤

炎症是 AKI 病理生理学过程的中心环节。Liu 等人^[11]将 AKI 患者来源的 CD4⁺ T 细胞与 hAECs 共培养, 发现 hAECs 可显著抑制 CD4⁺ T 细胞的增殖并下调 IL-2 的表达。hAECs 可分泌高水平的 microRNA-101, 阻止靶基因 *c-Rel* 与 NF- κ B 形成转录因子复合物, 减轻 AKI 患者的炎症反应。本研究组构建了不同损伤程度的 AKI 小鼠模型, 探讨了 hAECs 对缺血性 AKI 的作用, 结果显示, 注射 hAECs 可显著降低重度 AKI 小鼠的死亡率并改善其全身状态; hAECs 可通过抑制细胞凋亡、减少肾小管周毛细血管缺失和减轻肾脏局部免疫反应来改善肾功能; hAECs 可降低炎症因子 [IL-8、 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)] 的表达水平, 减少淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 发挥抗炎作用^[12]; 组学数据显示, hAEC-Exos 可能通过分泌大量 ECM 成分和血管生

成因子促进组织重塑和毛细血管生成,进而对抗肾脏损伤;另外,本研究组在 AKI 模型中还观察到了 hAECs 治疗后肾组织纤维化减少,提示 hAECs 可能延缓了 AKI 向慢性肾脏病转化的进程^[12]。

3.3 神经修复

近年来,诸多研究团队对 hAECs 中枢神经系统疾病治疗作用进行了全方位的研究。中风是全球死亡和致残的主要原因之一,尚无有效治疗方法。Evans 等人^[83]在缺血性脑中风动物模型中发现移植的 hAECs 可通过 4 型趋化因子受体依赖性机制迁移至受损伤的大脑区域,发挥减轻免疫细胞浸润、减少梗死面积的作用;此外,大量 hAECs 迁移至脾脏,有效抑制了中风后的全身免疫反应,有利于机体恢复和脑修复。在出血性脑损伤中,移植 hAECs 可提高病灶周围神经细胞的存活和再生,表现为血肿周围区域的小胶质细胞活化受到抑制, TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-12 的表达水平下调^[84, 85]。

SCI 是脊柱损伤最严重的并发症,往往导致损伤节段以下肢体的运动和感觉功能障碍。Sankar 等人^[86]发现在完全横断的脊髓中,移植的 hAECs 仍能很好地存活长达 60 天,移植部位未见白细胞浸润和胶质纤维形成;hAECs 促进了轴突的生长,并可预防横切部位的细胞死亡和新的侧枝生长。此外,将 hAECs 与丝蛋白支架联合移植可以更好地促进 SCI 的修复,丝蛋白支架可以为 hAECs 提供良好的神经再生微环境^[87]。

PD 是一种常见的老年神经系统退行性疾病,其特征是中脑黑质部位大量多巴胺能神经元逐渐丧失,胞浆内路易体聚集和神经炎症^[5]。已有研究证明,经纹状体注射的 hAECs 可以在体内存活长达 10 周,部分 hAECs 可分化为酪氨酸羟化酶阳性神经元,显著缓解 PD 症状并减少黑质中神经元的丢失^[56]。Zhang 等人^[88]进一步研究了 hAECs 改善 PD 症状的可能机制,发现 hAECs 可通过分泌多种神经营养因子、生长因子和神经元细胞黏附分子来促进受损的多巴胺能神经元及神经突触的生长;hAECs 能产生大量抗炎因子 IL-1ra 和神经炎症抑制因子减少小胶质细胞活化;hAECs 可激活抗氧化信号通路 STAT3、MAPK 和 PI3K/AKT,降低体内过量的活性氧水平。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是另一种不可逆的进行性神经退行性疾病,其特征性病理变化为大脑皮质萎缩,伴 β -淀粉样蛋白沉积,细

胞内神经原纤维缠结,大量记忆性神经元数目减少以及老年斑的形成^[89]。Kim 等人^[90]研究了 hAECs 在 AD 转基因小鼠模型中的治疗效果,发现脑内注射 hAECs 可减轻小鼠的认知功能障碍并减少淀粉样斑块形成。Xue 等人^[91]研究也显示,将 hAECs 移植到 AD 小鼠侧脑室可显著增加小鼠海马体内胆碱能神经元的数量以及乙酰胆碱的浓度。此外, hAECs 对于脑瘫^[92]和多发性硬化症^[46]也有良好的治疗效果。

3.4 自身免疫性疾病

1 型糖尿病又称为胰岛素依赖型糖尿病,该病患者由于自身免疫系统攻击胰岛 β 细胞,破坏了其分泌胰岛素的能力,需要注射外源性胰岛素来控制血糖。已经证明, hAECs 在体外可诱导分化为胰岛样细胞,将其移植入糖尿病小鼠肾包膜内,小鼠的高血糖症状明显得到改善,体重持续增加^[39]。Luo 等人^[55]发现,给糖尿病小鼠注射 hAECs 后,小鼠血浆胰岛素含量增加,糖耐量得到改善, hAECs 可促进胰腺 α 细胞向 β 细胞转分化,从而加速胰岛的功能恢复。门静脉胰岛移植是目前治疗 1 型糖尿病患者的理想方法,但移植期间胰岛细胞的大量丢失限制了这一方法的应用^[93]。Lebreton 等人^[94]将 hAECs 整合到胰岛细胞类器官中进行移植,发现移植的胰岛存活力和功能显著增强,糖尿病小鼠的血糖控制情况得到改善,提示这种混合型类器官可能成为治疗 1 型糖尿病的新型细胞治疗策略^[6]。此外,在糖尿病小鼠的皮肤溃疡伤口内注射 hAECs 或 hAEC-Exos 均可促进皮肤伤口愈合和肉芽组织的形成^[95, 96]。

在自身免疫性葡萄膜炎动物模型中, hAECs 可改善局部和全身细胞因子微环境。具体而言, hAECs 可抑制细胞因子 IL-17、IFN- γ 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 的表达,上调 IL-10 在局部和全身的表达^[97]。Tan 等人^[98]在桥本甲状腺炎和系统性红斑狼疮小鼠模型中证实了 hAECs 可调节 TH17 和 Treg 细胞的平衡, hAECs 通过抑制 IL-17A 和 IFN- γ , 上调 TGF- β 的表达,从而改善小鼠体内细胞因子环境。

3.5 肿瘤

恶性肿瘤是世界范围内导致死亡的主要原因之一。研究表明, hAECs 及 hAEC-CM 可抑制多种肿瘤细胞的增殖,包括宫颈癌 Hela 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞、人胰腺癌 PANC-1 细胞和大

鼠胶质瘤 C6 细胞等^[15, 99]。hAECs 通过诱导肿瘤细胞凋亡、刺激细胞周期停滞并抑制新生血管生成发挥其抗癌特性^[99, 100]。Kang 等人^[101]发现, 将 hAECs 移植到乳腺癌小鼠体内, 肿瘤体积显著缩小, 且并未发现任何副作用。本研究组在肺癌 A549 荷瘤小鼠中探索了 hAECs 的抗癌效果, 发现 hAECs 或 hAEC-Exos 与顺铂的联合使用比单一使用具有更好的抗癌作用, 具体表现为小鼠肿瘤体积显著缩小、重量减轻 (数据未发表)。

4 组织芯片

尽管 hAECs 的基础研究和临床前研究均取得了理想的结果, 但培养的细胞的生理学功能与人体真实情况存在显著差异, 预测效力有限; 实验动物与人体生理之间的固有差异也使得基础研究向临床转化的过程困难重重。一项新兴的科学技术——器官芯片 (organ-on-chip, OOC) 的出现对于实现基础研究向临床应用的转化具有革命性意义。OOC 是一种在芯片上构建的体外生理微系统, 它以微流控芯片为核心, 通过与细胞/组织生物学、生物材料和微流体工程学等多个领域相结合, 在体外模拟人体生理或病理状态, 反映不同条件下人体组织器官的主要结构和功能特征^[102]。

近两年来, 科学家们通过构建羊膜/胎膜 OOC, 深入研究了羊膜的发育过程和羊膜细胞之间的相互作用关系。Zhu 等人^[103]利用羊膜芯片为载体, 从人多能干细胞生成了羊膜样腔组织, 首次再现了妊娠中期的羊膜发育过程。人多能干细胞在灌注的 3D 培养微芯片中可自发组成羊膜上皮腔, 并且检测到羊膜上皮特异性基因在获得的腔中高度表达。Richardson 等人^[104, 105]则通过羊膜/胎膜 OOC 在体外研究了 AECs 与羊膜间质细胞 (amniotic mesenchymal cells, AMC) 和蜕膜细胞的互作关系。他们发现, 在妊娠期间, AECs 和 AMCs 可以相互转化, 经历了周期性的细胞重塑, 这是维持妊娠期间羊膜完整性和细胞内稳态所必需的。具体而言, 将 AECs 与 AMCs 在羊膜/胎膜 OOC 中共培养, AECs 可迁移、降解基础胶原蛋白并转化为 AMCs。在氧化应激条件下, AECs 会发生上皮-间充质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), 增加对自身胶原的降解并诱导炎症。相反地, 内源性孕酮可使新生的胶原蛋白填充降解的 ECM 成分, 将转化的 AMCs 再转变为 AECs。这些生物学过程参与

维持了妊娠期间羊膜的完整性和细胞内稳态^[105]。与传统的 2D 细胞培养和动物模型相比, OOC 可以更好地模拟和预测机体的生理状态, 在药物研发、疾病模型以及精准医疗等方面具有重要的指导意义。

5 hAECs 临床研究进展

5.1 hAECs 的安全性评价

hAECs 具有多能性为其提供了临床应用的可能性, 但细胞产品的安全性是开展临床试验的首要前提。目前, 关于 hAECs 的安全性评价主要集中在移植后的细胞毒性、致瘤性以及免疫原性 (见 2.2 节) 等方面。

Yang 等人^[28]按照药物安全性评估模式对 hAECs 进行了系统的安全评估, 结果显示给小鼠注射 hAECs 不会引发急性或长期毒性反应, 即使给小鼠注射最大耐受剂量 (1×10^8 个 hAECs/kg) 也未观察到小鼠行为、精神状态、血生化指标和组织学的改变。溶血和过敏试验的阴性结果也排除了 hAECs 注射引起血液系统和免疫系统的紊乱, hAECs 输注后, T 细胞的数量几乎没有变化。

致瘤性是干细胞治疗的另一个主要问题。据报道, MSCs 可促进肿瘤生长^[106]。然而, hAECs 已经在多种物种中证实无致瘤性^[8, 22]。20 世纪 80 年代, Akle 等人^[22]将 hAECs 移植到志愿者皮下后 7 周, 未发现肿瘤形成。Yang 等人^[28]将 hAECs 注射到免疫缺陷小鼠皮下 4 周, 也无肿瘤形成。这些结果均证实了 hAECs 应用的临床安全性。

5.2 hAECs 的临床试验

早在 1995 年起, 羊膜移植已经被成功用于治疗眼表疾病^[2]。截至 2021 年 2 月, 使用检索词“human amniotic epithelial cell”在两个临床数据库 (NIH Clinical Trial 和 Australian New Zealand Clinical Trials Registry) 中进行检索, 结果显示共有 18 项将 hAECs 用作生物干预措施的试验^[58]。

目前 hAECs 主要应用于临床 I&II 期试验中, 在包括支气管肺发育不良^[107]、肝纤维化^[77]、缺血性中风^[108]、移植物抗宿主病^[109]等临床试验中均显示出很好的临床安全性。在一项早产儿支气管肺发育不良的临床试验 (No. ACTRN12614000174684) 中, 施用 hAECs 后没有观察到任何急性不良事件的发生, 如过敏反应、感染、急性排斥反应或形成畸胎瘤^[107]。Lim 等人^[77]注册的临床试验 (No. ACTRN12616000437460) 旨在评估代偿性肝硬化患者

静脉注射异体 hAECs 的安全性, 这项 I 期临床试验将在 hAECs 输注后 24 h 内对接受移植的患者进行密切监测, 并进行长期随访和临床评估。一项 hAECs 治疗缺血性中风的临床 I 期试验 (No. AC-TRN1268000076279) 旨在评估异基因 hAECs 对脑卒中患者的安全性并明确治疗使用的细胞的最大耐受剂量^[108]。Zeng 等人^[109]使用 hAECs 治疗异基因造血干细胞移植后膜性肾病, 在 hAECs 输注 4 周后, 患者的肾功能得到了显著改善, 表现为 24 h 尿蛋白和 β_2 微球蛋白的减少以及血清白蛋白的升高, 值得注意的是, 在 hAECs 输注 6 周后, 患者的血清白蛋白水平已恢复至正常, 在治疗 10 个月后, 肾病综合征得以治愈。

尽管个别临床试验已经证明 hAECs 对疾病的病理生理学状态和生物化学指标均有一定程度的改善, 但 hAECs 达到临床级干细胞应用标准仍面临一些挑战。(1) hAECs 的体外分离与培养仍存在瓶颈: 尚未建立标准化 hAECs 分离培养方案, 羊膜不同区域来源的 hAECs 存在一定异质性, 上皮细胞体外培养过程中会自发地发生 EMT 等^[110]; (2) hAECs 体外传代代数可能影响临床应用: 原代和传代的 hAECs 分化能力、免疫抑制特性和旁分泌效应有所不同, 需根据情况选择合适的细胞代数^[111, 112]; (3) 潜在的微栓塞可能: 静脉注射是目前主要的细胞移植手段, hAECs 的使用浓度较高, 细胞直径较大, 移植后出现微栓塞的概率也相应增高; (4) 移植的 hAECs 缺乏长期的示踪信息; (5) 针对不同疾病 hAECs 发挥的作用不尽相同, 如何进行相应的评估仍需更细致的讨论; (6) 靶向治疗的可能性: 通过超声微泡等生物载体实现 hAECs 靶向受损器官发挥特定作用; (7) 综合处理使 hAECs 疗效最大化: 一些生物学预处理措施可能放大 hAECs 的修复作用, 达到更好的临床治疗效果; 生物材料与 hAECs 的联合使用可延长并增强 hAECs 的治疗作用, 并为 hAECs 促进组织再生和功能恢复提供良好的微环境^[113]。为了解决这些难题, 仍需大量的临床前研究以实现从基础研究向临床应用的转化。

6 小结

基于干细胞的细胞疗法目前已成为医学各领域中最有临床应用价值的方法之一。作为再生医学研究领域的种子细胞, hAECs 具有极高的临床实用性。

首先, hAECs 具有调节先天和适应免疫反应的能力, 这使其在治疗慢性炎症疾病、自身免疫性疾病和移植排斥反应中具有绝对优势。其次, hAECs 具有多谱系分化能力, 为组织工程提供了良好的细胞来源。最后, hAECs 可与生物支架相结合, 为构建良好的细胞和组织再生微环境提供了所有组件。虽然 hAECs 免疫调节的确切机制和移植后的细胞实际功能仍需进一步论证, 但 hAECs 的独特优势使其值得更多关注和深入研究。

参考文献

- 1 Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 11–22.
- 2 Abbaspanah B, Momeni M, Ebrahimi M, Mousavi SH. Advances in perinatal stem cells research: a precious cell source for clinical applications. *Regen Med* 2018; 13(5): 595–610.
- 3 Muttini A, Barboni B, Valbonetti L, Russo V, Maffulli N. Amniotic epithelial stem cells: Salient features and possible therapeutic role. *Sports Med Arthrosc Rev* 2018; 26(2): 70–74.
- 4 Miki T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2018; 80(4): e13003.
- 5 Xu H, Zhang J, Tsang KS, Yang H, Gao WQ. Therapeutic potential of human amniotic epithelial cells on injuries and disorders in the central nervous system. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 5432301.
- 6 Lebreton F, Bellofatto K, Wassmer CH, Perez L, Lavallard V, Parnaud G, Cottet-Dumoulin D, Kerr-Conte J, Pattou F, Bosco D, Othenin-Girard V, Martinez de Tejada B, Berishvili E. Shielding islets with human amniotic epithelial cells enhances islet engraftment and revascularization in a murine diabetes model. *Am J Transplant* 2020; 20(6): 1551–1561.
- 7 Liu QW, Liu QY, Li JY, Wei L, Ren KK, Zhang XC, Ding T, Xiao L, Zhang WJ, Wu HY, Xin HB. Therapeutic efficiency of human amniotic epithelial stem cell-derived functional hepatocyte-like cells in mice with acute hepatic failure. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 321.
- 8 Lin JS, Zhou L, Sagayaraj A, Jumat NHB, Choolani M, Chan JKY, Biswas A, Wong PC, Lim SG, Dan YY. Hepatic differentiation of human amniotic epithelial cells and *in vivo* therapeutic effect on animal model of cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30(11): 1673–1682.
- 9 Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams ED, Jenkin G, Wallace E, Trounson A, Manuelpillai

- U. Human amnion epithelial cell transplant abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(5): 643–651.
- 10 Tan JL, Tan YZ, Muljadi R, Chan ST, Lau SN, Mockler JC, Wallace EM, Lim R. Amnion epithelial cells promote lung repair via lipoxin A₄. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(4): 1085–1095.
 - 11 Liu J, Hua R, Gong Z, Shang B, Huang Y, Guo L, Liu T, Xue J. Human amniotic epithelial cells inhibit CD4⁺ T cell activation in acute kidney injury patients by influencing the miR-101-c-Rel-IL-2 pathway. *Mol Immunol* 2017; 81: 76–84.
 - 12 Ren Y, Chen Y, Zheng X, Wang H, Kang X, Tang J, Qu L, Shao X, Wang S, Li S, Liu G, Yang L. Human amniotic epithelial cells ameliorate kidney damage in ischemia-reperfusion mouse model of acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 410.
 - 13 Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, Lai D. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 270.
 - 14 Luo H, Lu Y, Wu T, Zhang M, Zhang Y, Jin Y. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn. *Biomaterials* 2013; 34(28): 6748–6759.
 - 15 Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy* 2014; 16(1): 33–40.
 - 16 Bourne GL. The anatomy of the human amnion and chorion. *Proc R Soc Med* 1966; 59(11 Part 1): 1127–1128.
 - 17 Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2(2): 133–142.
 - 18 Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2016; 31: 13–29.
 - 19 Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology* (5th Ed). Ann Arbor: Saunders Press, 2014, 117–135.
 - 20 Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Anatomy and pathology of the placental membranes. In: *Pathology of the Human Placenta*. New York: Springer, 2012, 249–307.
 - 21 Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem cells* 2005; 23(10): 1549–1559.
 - 22 Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2(8254): 1003–1005.
 - 23 Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis ECS, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010; Chapter 1: Unit 1E.3.
 - 24 Tabatabaei M, Mosaffa N, Nikoo S, Bozorgmehr M, Ghods R, Kazemnejad S, Rezaei S, Keshavarzi B, Arefi S, Ramezani-Tehrani F, Mirzadegan E, Zarnani AH. Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014; 6(1): 10–20.
 - 25 Gramignoli R, Srinivasan RC, Kannisto K, Strom SC. Isolation of human amnion epithelial cells according to current good manufacturing procedures. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2016; 37: 1E.10.1–1E.10.13.
 - 26 Motedayyen H, Esmaeil N, Tajik N, Khadem F, Ghotloo S, Khani B, Rezaei A. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC Res Notes* 2017; 10(1): 552.
 - 27 Evron A, Goldman S, Shalev E. Human amniotic epithelial cells cultured in substitute serum medium maintain their stem cell characteristics for up to four passages. *Int J Stem Cells* 2011; 4(2): 123–132.
 - 28 Yang PJ, Yuan WX, Liu J, Li JY, Tan B, Qiu C, Zhu XL, Qiu C, Lai DM, Guo LH, Yu LY. Biological characterization of human amniotic epithelial cells in a serum-free system and their safety evaluation. *Acta Pharmacol Sin* 2018; 39(8): 1305–1316.
 - 29 Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006; 25(10 Suppl 1): S53–S58.
 - 30 Miki T. A rational strategy for the use of amniotic epithelial stem cell therapy for liver diseases. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(4): 405–409.
 - 31 Bilic G, Zeisberger SM, Mallik AS, Zimmermann R, Zisch AH. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* 2008; 17(8): 955–968.
 - 32 Qiu C, Ge Z, Cui W, Yu L, Li J. Human amniotic epithelial stem cells: A promising seed cell for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20): 7730.
 - 33 Izumi M, Pazin BJ, Minervini CF, Gerlach J, Ross MA, Stolz DB, Turner ME, Thompson RL, Miki T. Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *J Reprod Immunol* 2009; 81(1): 39–43.
 - 34 Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 2007; 75(2): 91–96.
 - 35 Bryzek A, Czekaj P, Plewka D, Komarska H, Tomsia M, Lesiak M, Sieroń AL, Sikora J, Kopaczka K. Expression

- and co-expression of surface markers of pluripotency on human amniotic cells cultured in different growth media. *Ginek Pol* 2013; 84(12): 1012–1024.
- 36 Centurione L, Passaretta F, Centurione MA, Munari SD, Vertua E, Silini A, Liberati M, Parolini O, Di Pietro R. Mapping of the human placenta: experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity. *Cell Transplant* 2018; 27(1): 12–22.
 - 37 Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77(3): 577–588.
 - 38 Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 1996; 209(1): 9–12.
 - 39 Hou Y, Huang Q, Liu T, Guo L. Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; 40(9): 830–839.
 - 40 Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, Miki T, Ranade AR, Paola Serra M, Doratiotto S, Sini M, Sharma S, Mitamura K, Sellaro TL, Tahan V, Skvorak KJ, Ellis ECS, Badyalak SF, Davila JC, Hines R, Laconi E, Strom SC. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology* 2011; 53(5): 1719–1729.
 - 41 Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, Yamagiwa Y, Fukushima K, Gershwin ME, Shimosegawa T. Amniotic epithelial cell-derived cholangiocytes in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Hepatol Res* 2007; 37(4): 286–294.
 - 42 Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2(3): 25.
 - 43 Morandi F, Marimpietri D, Görgens A, Gallo A, Srinivasan RC, El-Andaloussi S, Gramignoli R. Human amnion epithelial cells impair T cell proliferation: The role of HLA-G and HLA-E molecules. *Cells* 2020; 9(9): 2123.
 - 44 Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning* 2014; 7: 53–63.
 - 45 Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, Alizadeh H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3): 900–907.
 - 46 McDonald CA, Payne NL, Sun G, Moussa L, Siatskas C, Lim R, Wallace EM, Jenkin G, Bernard CC. Immunosuppressive potential of human amnion epithelial cells in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 112.
 - 47 Tan JL, Chan ST, Wallace EM, Lim R. Human amnion epithelial cells mediate lung repair by directly modulating macrophage recruitment and polarization. *Cell Transplant* 2014; 23(3): 319–328.
 - 48 Li J, Koike-Soko C, Sugimoto J, Yoshida T, Okabe M, Nikaido T. Human amnion-derived stem cells have immunosuppressive properties on NK cells and monocytes. *Cell Transplant* 2015; 24(10): 2065–2076.
 - 49 Magatti M, Cargnoni A, Silini AR, Parolini O. *Perinatal Stem Cells*. Boston: Academic Press, 2018, 147–155.
 - 50 Wassmer CH, Berishvili E. Immunomodulatory properties of amniotic membrane derivatives and their potential in regenerative medicine. *Curr Diab Rep* 2020; 20(8): 31.
 - 51 Tan JL, Chan ST, Lo CY, Deane JA, McDonald CA, Bernard CC, Wallace EM, Lim R. Amnion cell-mediated immune modulation following bleomycin challenge: controlling the regulatory T cell response. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 8.
 - 52 Liu T, Wu J, Huang Q, Hou Y, Jiang Z, Zang S, Guo L. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008; 29(5): 603–611.
 - 53 Hodges RJ, Jenkin G, Hooper SB, Allison B, Lim R, Dickinson H, Miller SL, Vosdoganes P, Wallace EM. Human amnion epithelial cells reduce ventilation-induced preterm lung injury in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(5): 448.e8–15.
 - 54 Srinivasan RC, Kannisto K, Strom SC, Gramignoli R. Evaluation of different routes of administration and biodistribution of human amnion epithelial cells in mice. *Cytherapy* 2019; 21(1): 113–124.
 - 55 Luo Y, Cheng YW, Yu CY, Liu RM, Zhao YJ, Chen DX, Zhong JJ, Xiao JH. Effects of hyaluronic acid on differentiation of human amniotic epithelial cells and cell-replacement therapy in type 1 diabetic mice. *Exp Cell Res* 2019; 384(2): 111642.
 - 56 Zhang Q, Lai D. Application of human amniotic epithelial cells in regenerative medicine: a systematic review. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 439.
 - 57 Bulati M, Miceli V, Gallo A, Amico G, Carcione C, Pampalona M, Conaldi PG. The immunomodulatory properties of the human amnion-derived mesenchymal stromal/stem cells are induced by INF- γ produced by activated lymphomonocytes and are mediated by cell-to-cell contact and soluble factors. *Front Immunol* 2020; 11: 54.
 - 58 Ji J, Yang L. *Regenerative Nephrology* (2nd Ed). Valhalla: Academic Press, 2022, 169–188.
 - 59 Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; 188(1): 21–28.

- 60 Wu Q, Fang T, Lang H, Chen M, Shi P, Pang X, Qi G. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells. *Int J Mol Med* 2017; 39(4): 918–926.
- 61 Lim R, Chan ST, Tan JL, Mockler JC, Murphy SV, Wallace EM. Preterm human amnion epithelial cells have limited reparative potential. *Placenta* 2013; 34(6): 486–492.
- 62 Zhu D, Muljadi R, Chan ST, Vosdoganes P, Lo C, Mockler JC, Wallace EM, Lim R. Evaluating the impact of human amnion epithelial cells on angiogenesis. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4565612.
- 63 Farhadihosseinabadi B, Farahani M, Tayebi T, Jafari A, Biniazan F, Modaresifar K, Moravvej H, Bahrami S, Redl H, Tayebi L, Niknejad H. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup2): 431–440.
- 64 Zhao B, Liu JQ, Yang C, Zheng Z, Zhou Q, Guan H, Su LL, Hu DH. Human amniotic epithelial cells attenuate TGF- β 1-induced human dermal fibroblast transformation to myofibroblasts via TGF- β 1/Smad3 pathway. *Cytotherapy* 2016; 18(8): 1012–1024.
- 65 Andrewartha N, Yeoh G. Human amnion epithelial cell therapy for chronic liver disease. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 8106482.
- 66 Docherty MH, O’Sullivan ED, Bonventre JV, Ferenbach DA. Cellular senescence in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30(5): 726–736.
- 67 Pan C, Lang H, Zhang T, Wang R, Lin X, Shi P, Zhao F, Pang X. Conditioned medium derived from human amniotic stem cells delays H₂O₂-induced premature senescence in human dermal fibroblasts. *Int J Mol Med* 2019; 44(5): 1629–1640.
- 68 Di Germanio C, Bernier M, Petr M, Mattioli M, Barboni B, de Cabo R. Conditioned medium derived from rat amniotic epithelial cells confers protection against inflammation, cancer, and senescence. *Oncotarget* 2016; 7(26): 39051–39064.
- 69 Kalluri R, LeBleu VS. The biology function and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020; 367(6478): eaau6977.
- 70 Zhao B, Li X, Shi X, Shi X, Zhang W, Wu G, Wang X, Su L, Hu D. Exosomal microRNAs derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing by promoting the proliferation and migration of fibroblasts. *Stem Cells Int* 2018; 2018: 5420463.
- 71 Tan JL, Lau SN, Leaw B, Nguyen HPT, Salamonsen LA, Saad MI, Chan ST, Zhu D, Krause M, Kim C, Sievert W, Wallace EM, Lim R. Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(2): 180–196.
- 72 Zhang Q, Sun J, Huang Y, Bu S, Guo Y, Gu T, Li B, Wang C, Lai D. Human amniotic epithelial cell-derived exosomes restore ovarian function by transferring microRNAs against apoptosis. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 16: 407–418.
- 73 Zhao B, Zhang Y, Han S, Zhang W, Zhou Q, Guan H, Liu J, Shi J, Su L, Hu D. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J Mol Histol* 2017; 48(2): 121–132.
- 74 Kuk N, Hodge A, Sun Y, Correia J, Alhomrani M, Samuel C, Moore G, Lim R, Sievert W. Human amnion epithelial cells and their soluble factors reduce liver fibrosis in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2019; 34(8): 1441–1449.
- 75 Cargnoni A, Farigu S, Cotti Piccinelli E, Bonassi Signoroni P, Romele P, Vanosi G, Toschi I, Cesari V, Barros Sant’Anna L, Magatti M, Silini AR, Parolini O. Effect of human amniotic epithelial cells on pro-fibrogenic resident hepatic cells in a rat model of liver fibrosis. *J Cell Mol Med* 2018; 22(2): 1202–1213.
- 76 Hodge A, Andrewartha N, Lourensz D, Strauss R, Correia J, Goonetilleke M, Yeoh G, Lim R, Sievert W. Human amnion epithelial cells produce soluble factors that enhance liver repair by reducing fibrosis while maintaining regeneration in a model of chronic liver injury. *Cell Transplant* 2020; 29: 963689720950221.
- 77 Lim R, Hodge A, Moore G, Wallace EM, Sievert W. A pilot study evaluating the safety of intravenously administered human amnion epithelial cells for the treatment of hepatic fibrosis. *Front Pharmacol* 2017; 8: 549.
- 78 Li B, Zhang Q, Sun J, Lai D. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 257.
- 79 Bai X, Liu J, Yuan W, Liu Y, Li W, Cao S, Yu L, Wang L. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cells in rat models of intrauterine adhesions. *Cell Transplant* 2020; 29: 963689720908495.
- 80 Aonuma K, Ferdousi F, Xu D, Tominaga K, Isoda H. Effects of isorhamnetin in human amniotic epithelial stem cells and its cardioprotective effects. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 578197.
- 81 Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, Williams ED, Sievert W. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl₄-treated mice. *Cell Transplant* 2010; 19(9): 1157–1168.

- 82 Alhomrani M, Correia J, Zavou M, Leaw B, Kuk N, Xu R, Saad MI, Hodge A, Greening DW, Lim R, Sievert W. The human amnion epithelial cell secretome decreases hepatic fibrosis in mice with chronic liver fibrosis. *Front Pharmacol* 2017; 8: 748.
- 83 Evans MA, Lim R, Kim HA, Chu HX, Gardiner-Mann CV, Taylor KWE, Chan CT, Brait VH, Lee S, Dinh QN, Vinh A, Phan TG, Srikanth VK, Ma H, Arumugam TV, Fann DY, Poh L, Hunt CPJ, Pouton CW, Haynes JM, Selemidis S, Kwan W, Teo L, Bourne JA, Neumann S, Young S, Gowing EK, Drummond GR, Clarkson AN, Wallace EM, Sobey CG, Broughton BRS. Acute or delayed systemic administration of human amnion epithelial cells improves outcomes in experimental stroke. *Stroke* 2018; 49(3): 700–709.
- 84 Zhou H, Mu Z, Chen X, Shi Z, Zha Z, Liu Y, Xu Z. HAEC in the treatment of brain hemorrhage: a preliminary observation in rabbits. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(6): 6772–6778.
- 85 Dong W, Chen H, Yang X, Guo L, Hui G. Treatment of intracerebral haemorrhage in rats with intraventricular transplantation of human amniotic epithelial cells. *Cell Biol Int* 2010; 34(6): 573–577.
- 86 Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003; 118(1): 11–17.
- 87 Wang TG, Xu J, Zhu AH, Lu H, Miao ZN, Zhao P, Hui GZ, Wu WJ. Human amniotic epithelial cells combined with silk fibroin scaffold in the repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2016; 11(10): 1670–1677.
- 88 Zhang J, Li H, Yang H, Lin J, Wang Y, Zhang Q, Gao WQ, Xu H. Human amniotic epithelial cells alleviate a mouse model of Parkinson's disease mainly by neuroprotective, anti-oxidative and anti-inflammatory factors. *J Neuroimmune Pharmacol* 2021; 16(3): 620–633.
- 89 Marlatt MW, Lucassen PJ. Neurogenesis and Alzheimer's disease: Biology and pathophysiology in mice and men. *Curr Alzheimer Res* 2010; 7(2): 113–125.
- 90 Kim KY, Suh YH, Chang KA. Therapeutic effects of human amniotic epithelial stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7): 2658.
- 91 Xue S, Chen C, Dong W, Hui G, Liu T, Guo L. Therapeutic effects of human amniotic epithelial cell transplantation on double-transgenic mice co-expressing APP^{swe} and PS1^{ΔE9}-deleted genes. *Sci China Life Sci* 2012; 55(2): 132–140.
- 92 Leaw B, Zhu D, Tan J, Muljadi R, Saad MI, Mockler JC, Wallace EM, Lim R, Tolcos M. Human amnion epithelial cells rescue cell death via immunomodulation of microglia in a mouse model of perinatal brain injury. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 46.
- 93 Aghazadeh Y, Nostro MC. Cell therapy for type 1 diabetes: Current and future strategies. *Curr Diab Rep* 2017; 17(6): 37.
- 94 Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, Bonnet R, Wassmer CH, Perez L, Kalandadze V, Follenzi A, Boulvain M, Kerr-Conte J, Goodman DJ, Bosco D, Berney T, Berishvili E. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun* 2019; 10(1): 4491–4491.
- 95 Zheng Y, Zheng S, Fan X, Li L, Xiao Y, Luo P, Liu Y, Wang L, Cui Z, He F, Liu Y, Xiao S, Xia Z. Amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing by modulating inflammation and promoting neovascularization. *Stem Cells Int* 2018; 2018: 1082076.
- 96 Wei P, Zhong C, Yang X, Shu F, Xiao S, Gong T, Luo P, Li L, Chen Z, Zheng Y, Xia Z. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing via PI3K-AKT-mTOR-mediated promotion in angiogenesis and fibroblast function. *Burns Trauma* 2020; 8: tkaa020.
- 97 Li J, Qiu C, Zhang Z, Yuan W, Ge Z, Tan B, Yang P, Liu J, Zhu X, Qiu C, Lai D, Guo L, Yu L. Subretinal transplantation of human amniotic epithelial cells in the treatment of autoimmune uveitis in rats. *Cell Transplant* 2018; 27(10): 1504–1514.
- 98 Tan B, Yuan W, Li J, Yang P, Ge Z, Liu J, Qiu C, Zhu X, Qiu C, Lai D, Guo L, Wang L, Yu L. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cells in murine models of Hashimoto's thyroiditis and systemic lupus erythematosus. *Cytotherapy* 2018; 20(10): 1247–1258.
- 99 Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. *Cell Tissue Res* 2016; 363(3): 599–608.
- 100 Bu S, Zhang Q, Wang Q, Lai D. Human amniotic epithelial cells inhibit growth of epithelial ovarian cancer cells via TGF- β 1-mediated cell cycle arrest. *Int J Oncol* 2017; 51(5): 1405–1414.
- 101 Kang NH, Yi BR, Lim SY, Hwang KA, Baek YS, Kang KS, Choi KC. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *Int J Oncol* 2012; 40(6): 2022–2028.
- 102 Ronaldson-Bouchard K, Vunjak-Novakovic G. Organs-on-a-chip: A fast track for engineered human tissues in drug development. *Cell Stem Cell* 2018; 22(3): 310–324.
- 103 Zhu Y, Wang H, Yin F, Guo Y, Li F, Gao D, Qin J. Amnion-on-a-chip: modeling human amniotic development in mid-gestation from pluripotent stem cells. *Lab Chip* 2020;

- 20(17): 3258–3268.
- 104 Richardson L, Gnecco J, Ding T, Osteen K, Rogers LM, Aronoff DM, Menon R. Fetal membrane organ-on-chip: An innovative approach to study cellular interactions. *Reprod Sci* 2020; 27(8): 1562–1569.
 - 105 Richardson L, Jeong S, Kim S, Han A, Menon R. Amnion membrane organ-on-chip: an innovative approach to study cellular interactions. *FASEB J* 2019; 33(8): 8945–8960.
 - 106 Lynch ME, Chiou AE, Lee MJ, Marcott SC, Polamraju PV, Lee Y, Fischbach C. Three-dimensional mechanical loading modulates the osteogenic response of mesenchymal stem cells to tumor-derived soluble signals. *Tissue Eng Part A* 2016; 22(15–16): 1006–1015.
 - 107 Lim R, Malhotra A, Tan J, Chan ST, Lau S, Zhu D, Mockler JC, Wallace EM. First-in-human administration of allogeneic amnion cells in premature infants with bronchopulmonary dysplasia: A safety study. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(9): 628–635.
 - 108 Phan TG, Ma H, Lim R, Sobey CG, Wallace EM. Phase 1 trial of amnion cell therapy for ischemic stroke. *Front Neurol* 2018; 9: 198.
 - 109 Zeng HG (曾胡广), Sun J, Liu WB, Wu DJ, Hu HJ, Yu QH, Shen YP, Zhou YH, Ye BD. A case of membrane nephropathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation treatment with human amniotic epithelial cells. *Chin J Transpl (Elect Ed)* (中华移植杂志电子版) 2019; 13(3): 242–244 (in Chinese).
 - 110 Ghamari S-H, Abbasi-Kangevari M, Tayebi T, Bahrami S, Niknejad H. The bottlenecks in translating placenta-derived amniotic epithelial and mesenchymal stromal cells into the clinic: Current discrepancies in marker reports. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 180.
 - 111 Pratama G, Vaghjiani V, Tee JY, Liu YH, Chan J, Tan C, Murthi P, Gargett C, Manuelpillai U. Changes in culture expanded human amniotic epithelial cells: implications for potential therapeutic applications. *PLoS One* 2011; 6(11): e26136.
 - 112 He F, Zhou A, Feng S. Use of human amniotic epithelial cells in mouse models of bleomycin-induced lung fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018; 13(5): e0197658.
 - 113 El Khatib M, Mauro A, Di Mattia M, Wyrwa R, Schweder M, Ancora M, Lazzaro F, Berardinelli P, Valbonetti L, Di Giacinto O, Polci A, Cammà C, Schnabelrauch M, Barboni B, Russo V. Electrospun PLGA fiber diameter and alignment of tendon biomimetic fleece potentiate tenogenic differentiation and immunomodulatory function of amniotic epithelial stem cells. *Cells* 2020; 9(5): 1207.