

基础研究

低温冻存对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响

王 军^{1,2}, 孔维霞^{1,2}, 徐 曼^{1,2}, 盛宏霞^{1,2}, 扈江伟^{1,2}, 廖 丽^{1,2}, 汤永永^{1,2}, 宁红梅^{1,2}, 张 斌^{1,2}, 陈 虎^{1,2}
¹军事医学科学院附属医院 造血干细胞移植科, 北京 100071 ;²军事医学科学院 细胞与基因治疗中心, 北京 100071

摘要 :目的 比较人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells ,UC-MSCs)冻存前与复苏后的生物学特性,为规模化储备 UC-MSCs 提供试验支持。方法 采用胶原酶消化法从脐带中分离 UC-MSCs,贴壁培养传代,将第3代 UC-MSCs 利用程控降温仪冷冻,置于 -196 ℃液氮中冻存6个月后复苏,比较冻存前和复苏后 UC-MSCs 的细胞形态、生长曲线、免疫表型及多向分化潜能等生物学特性。结果 复苏后 UC-MSCs 仍呈成纤维样形态生长,生长曲线与冻存前相似;免疫表型仍高表达 CD73、CD90、CD105,不表达 CD34、CD45、CD40、CD80、CD86、CD154、HLA-DR;在特定的体外诱导条件下,仍可以向骨、脂肪、软骨分化。结论 冻存复苏后 UC-MSCs 的生物学特性仍保持稳定。

关键词 :间充质干细胞;脐带;冻存;生物学特性

中图分类号 :R 35 文献标识码 :A 文章编号 :1005-1139(2012)11-1152-05 DOI :10.3969/j.issn.1005-1139.2012.11.021

网络出版时间 :2012-05-07 09:30 网络出版地址 :http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20120507.0930.001.html

Effect of cryopreservation on biological features of human umbilical cord mesenchymal stem cells

WANG Jun^{1,2}, KONG Wei-xia^{1,2}, XU Man^{1,2}, SHENG Hong-xia^{1,2}, HU Jiang-wei^{1,2}, LIAO Li^{1,2}, TANG Yong-yong^{1,2}, NING Hong-mei^{1,2}, ZHANG Bin^{1,2}, CHEN Hu^{1,2}

¹Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; ²Cell and Gene Therapy Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: CHEN Hu. Email: chenhu217@yahoo.com.cn; ZHANG Bin. Email: zbctc307@163.com

Abstract: Objective To provide the experimental support for large-scale preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC) by comparing their biological features before cryopreservation and after thawing. **Methods** Human UC-MSC were isolated by collagenase digestion and subcultured in vitro. The third passage human UC-MSC were frozen with a controlled rate freezer and thawed 6 months after they were stored in -196 ℃ liquid nitrogen. Their biological features were compared, including morphology, growth curve, immunophenotype and multi-directional differentiation potential before cryopreservation and after thawing. **Results** The human UC-MSC grew in a fibroblastic morphology after thawing with a similar growth curve to that before cryopreservation. The immunophenotype of human UC-MSC highly expressed the CD73, CD90, CD105 but not the CD34, CD45, CD40, CD80, CD86, CD154, HLA-DR. Human UC-MSC could differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes under special in vitro induction conditions. **Conclusion** Human UC-MSC can maintain their biological features after cryopreservation and thawing.

Key words: mesenchymal stem cells; umbilical cord; cryopreservation; biological characteristics

目前国内外已开展了许多有关间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的临床试验及应用研究,主要用于造血支持、免疫调控、再生修复等方面^[1],如再生障碍性贫血、移植物抗宿主病^[2]、辐射损伤^[3]、自身免疫性疾病^[4]、难愈性组织损伤

以及神经系统退行性病等多种难治性疾病。MSCs 存在于骨髓、脂肪、脐带等全身多种组织中,而脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)因其取材方便、无伦理学问题、增殖能力更强、易于规模化制备等优越性,越来越受到关注,具有广阔的临床应用前景^[5]。但是,原代 MSCs 不仅细胞纯度不高,而且数量上也不能满足临床治疗需求,必须经过体外培养扩增的过程。因此,为了在最佳治疗时间获得足够数量的 MSCs,或者是保存需要,必须长期储存足够数量的 MSCs^[6],建立一定规模的 MSCs 储备库。本研究利用程控降温仪冷冻第3代 UC-MSCs,置于 -196 ℃液氮中冻存6个月后复苏,初步研究程控降温冻存-复苏对 UC-MSCs 生物学特性的影响,为规模

收稿日期 :2012-03-20

修回日期 :2012-04-22

基金项目 :国家“863”计划项目(2011AA020114);国家自然科学基金项目(81070435)

Supported by“863”Program of China(2011AA020114); National Natural Science Foundation of China(81070435)

作者简介 :王军,男,硕士,主治医师。研究方向 :血液病及放射病的诊治及造血干细胞移植。Email: wjhcy1@163.com

通信作者 :陈虎,男,博士,主任医师,博士生导师。Email: chenhu217@yahoo.com.cn ;张斌,男,博士,副教授,硕士生导师。Email: zbctc307@163.com

化储备 UC-MSCs 提供试验支持。

材料和方法

1 主要试剂和仪器 DMEM/F12 培养基 (Hyclone 公司), 胎牛血清 (FBS)(Gibco 公司); 型胶原酶 (Gibco 公司), 胰蛋白酶 (Amresco 公司); 二甲基亚砜 (DMSO)(Origen Biomedical 公司); 鼠抗人单克隆抗体 CD34-PE、CD40-PE、CD73-PE、CD80-PE、CD105-PE、HLA-DR-FITC、CD45-FITC、CD86-FITC、CD90-FITC、CD154-FITC 及其相应同型对照 (Becton Dickinson 公司); TGF- β_3 (R&D 公司), 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸磷酸盐、3-异丁酸-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素、吲哚美辛、ITS+1、丙酮酸钠、油红 O、阿尔辛蓝、碱性磷酸酶染色试剂盒 (Sigma 公司); 倒置相差显微镜 (Olympus 公司); 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司); 生物净化工作台 (青岛海尔); CO₂ 细胞培养箱 (SANYO 公司); 离心机 (上海安亭), 低温高速离心机 (GS-15R, Beckman 公司); 程控降温仪 (Thermo 公司)。

2 标本采集 脐带均于 2011 年取自武警总医院产科, 经父母授权同意后, 在无菌条件下取健康足月新生儿的脐带 3 份, 浸泡于无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。

3 UC-MSCs 的分离培养 无菌条件下用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 反复冲洗脐带, 去除残余血液, 将其剪成 1-2mm³ 左右的小块, 加入终浓度为 0.1% 的型胶原酶, 置于 37 消化 1h 左右, 观察到组织块边缘松软, 停止消化。过不锈钢筛网, 得到细胞悬液, 经 350g × 30min 离心后, 弃上清, 得到的细胞沉淀用 PBS 洗 2 次。弃上清, 将沉淀的细胞重悬于培养液中, 按 1 × 10⁵ 个/cm² 接种于 75cm² 培养瓶中, 培养体系含 10%FBS、DMEM/F12 培养基、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素。置于 37, 5%CO₂, 湿度 >95% 的培养箱中培养, 每天在倒置显微镜下观察细胞形态。48h 后换液, 弃未贴壁细胞, 以后每隔 72-96h 换液, 培养至 80%-90% 融合时, 进行传代培养。

4 冻存及复苏 当第 3 代 UC-MSCs 培养至 80%-90% 融合时, 加入 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化, 离心弃上清, 加入含 10% DMSO、40% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 调整细胞终浓度为 5 × 10⁶/ml, 分装于冻存管中。采用程控降温仪梯度降温至 -80, 浸入 -196 液氮中保存 6 个月。复苏时, 将冻存管取出直接浸入 37 恒温水浴箱内, 并摇动令其尽

快融化。在超净工作台内, 吸出细胞悬液, 转移至离心管中并加 10 倍以上培养液混匀, 离心弃上清, 重悬于完全培养基中培养, 每天在倒置显微镜下观察细胞形态, 待细胞达到 80%-90% 融合时, 常规消化传代。另外, 取部分复苏后的细胞进行其他生物学特性检测。

5 细胞活率检测 在冻存前及复苏后取部分细胞, 调整细胞浓度, 胎盼兰染色, 采用血球计数板计数法, 置于倒置显微镜下计数。活率 = (活细胞总数 / 细胞总数) × 100%。

6 生长曲线绘制 取冻存前及复苏后 UC-MSCs, 用培养液制成 1 × 10⁴/ml 细胞悬液, 按 1ml/孔接种于 24 孔板内, 置于 37 5%CO₂ 培养箱中, 每隔 24h 消化 3 个孔, 收集细胞并用胎盼兰染色计数活细胞, 计算均值, 绘制生长曲线。

7 细胞周期测定 取冻存前及复苏后 UC-MSCs 约 1 × 10⁶ 个细胞, 离心弃上清, 加入 300 μl 预冷的 PBS(4) 制成单细胞悬液, 逐滴加入 700 μl 预冷的无水乙醇 (-20) 固定, -20 放置待测。上机检测前加入 PBS 稀释细胞, 离心弃上清, 加入终浓度 500 μg/ml 的 RnaseA 置于 37 孵育 30min, 再加入终浓度 50 μg/ml 的碘化丙啶, 4 避光孵育 30min。流式细胞仪检测 DNA 含量, ModiFIT 软件分析结果。

8 免疫表型检测 取冻存前及复苏后细胞, 重悬于含 20g/L 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 中, 按每管 2 × 10⁵ 个细胞, 分别加入 10 μl PE 标记的 CD34、CD40、CD73、CD80、CD105 以及 FITC 标记的 CD45、CD86、CD90、CD154、HLA-DR 鼠抗人单克隆抗体, 另设 1 管同型对照, 4 避光孵育 30min, 用含 20g/L BSA 的 PBS 洗 2 次减少非特异性结合, 离心后重悬于 PBS 中进行流式细胞仪检测。

9 多向分化潜能检测 取冻存前及复苏后细胞, 按 8 × 10⁴/孔接种于 6 孔板, 置于 5% CO₂、37 培养箱中, 24h 后分别更换成骨及成脂诱导体系, 每隔 3d 换液。成骨诱导体系含 10% FBS、0.1 μmol/L 地塞米松、50 μmol/L 抗坏血酸、10mmol/L β -甘油磷酸钠, 2 周后碱性磷酸酶 (ALP) 染色。成脂诱导体系含 10% FBS、1 μmol/L 地塞米松、0.5mmol/L IBMX、10mmol/L 胰岛素、200 μmol/L 吲哚美辛, 2 周后进行油红 O 染色。另外, 将细胞按 4 × 10⁵/管接种于 15ml 尖底塑料离心管中, 离心后, 旋松离心管盖, 正立于培养箱中 24h 后, 加入软骨诱导体系, 含 0.1 μmol/L 地塞米松、50 μmol/L 抗坏血酸、1mmol/L 丙酮酸钠、10ng/ml TGF- β_3 、1% ITS+1, 每 3d 换液, 4 周后将小细胞团用石蜡包埋、

切片,并用阿尔辛蓝染色检测。

10 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 UC-MSCs 冻存复苏后的活率 采用台盼兰染色的方法计数,第3代 UC-MSCs 冻存前平均活率为 97.32%,经冻存复苏后平均活率为 96.57%,但二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 细胞形态 冻存前第3代 UC-MSCs 融合达 80% 以上,细胞形态均一,呈梭形,漩涡状生长(图 1A),复苏后的细胞约 12-24h 即完全贴壁,3-4d 后细胞融合即达 80% 以上,细胞形态较冻存前无明显改变(图 1B),常规胰酶消化后可继续传代培养。

3 生长曲线 采用细胞计数法绘制 hUCMSC 冻存前及复苏后的生长曲线,二者无明显差异,均呈“S”形,细胞接种后 2-3d 即进入对数生长期,7-8d 进入停滞期(图 2)。

4 细胞周期 流式细胞仪检测显示第3代 hUCMSC 冻存前与复苏后均有 90% 以上的细胞处于 G0/G1 期(图 3),说明冻存复苏后 UC-MSCs 仍具有典型的干细胞增殖特点。

5 免疫表型 冻存前及复苏后 UC-MSCs 均高表达 CD73、CD90、CD105,不表达或低表达 CD34、CD45、HLA-DR、CD80、CD86、CD40、CD154(图 4),二者无统计学差异,表明冻存复苏并未影响 UC-MSCs 的免疫表型。

6 诱导分化 冻存复苏后的 UC-MSCs 成骨诱导 2 周后 ALP 染色可见细胞呈蓝紫色(图 5A);成脂诱导 2 周后油红 O 染色可见胞浆内脂滴形成(图 5B);成软骨诱导 4 周后阿尔辛蓝染色可见细胞外基质呈蓝色(图 5C)。说明冻存复苏后 UC-MSCs 的多向分化潜能保持不变。

讨 论

MSCs 是一种具有自我更新及多向分化潜能的成体干细胞,能够分泌多种细胞因子,参与免疫调控^[7-8],还可以在体内或体外分化为脂肪、骨、软骨、神经、肝、心肌、汗腺^[9]等多种组织细胞,而且 MSCs 还具有免疫原性低、易于分离培养、体外大量扩增等特点,近年已成为生命科学领域的热点。而 UC-MSCs 的冻存与复苏是保证其临床应用安全、及时以及规模化储备的重要环节。合理保存特定代次的 UC-MSCs,不仅能够保证有足够

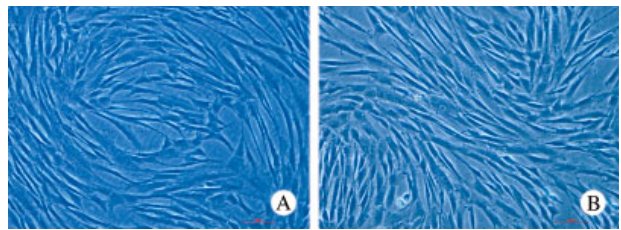


图 1 人脐带间充质干细胞冻存前后的细胞形态
Fig 1 Morphology of human UC-MSC before (A) and after (B) cryopreservation

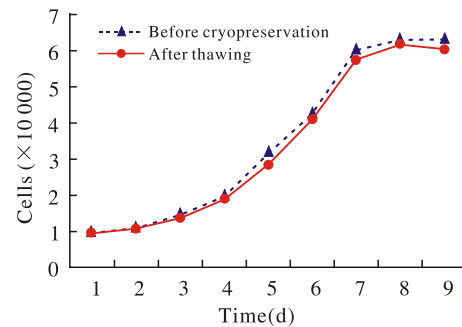


图 2 人脐带间充质干细胞冻存复苏前后的生长曲线
Fig 2 Growth curve of human UC-MSC before cryopreservation and after thawing

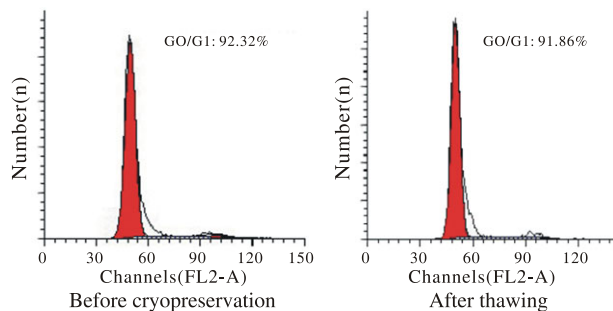


图 3 人脐带间充质干细胞冻存复苏前后的细胞周期
Fig 3 Cell cycle of human UC-MSC before cryopreservation and after thawing

数量的细胞及时满足临床治疗需要,而且可以避免连续多次传代造成的细胞老化、活力降低、污染、浪费等不利因素。

本研究采用程控降温仪冷冻 UC-MSCs,原理与梯度降温法相同,操作方便,耗时短,程序可控,干扰因素少,易标准化操作,是大量冷冻细胞的较佳选择。UC-MSCs 在 -196 液氮中冻存 6 个月后复苏。我们对冻存前及复苏后的 UC-MSCs 进行了生物学特性的比较,发现复苏后的细胞仍能保持 95% 以上的活率,并能继续传代培养,呈成纤维样形态生长,形态均一,生长良好。冻存复苏后 UC-MSCs 仍高表达 CD73、CD90、CD105,不表达或低表达 CD34、CD45、HLA-DR、CD80、CD86、CD40、CD154,免疫表型符合国际细胞移植学会对 MSCs 的鉴定标准^[10]。同时,冻存复苏后

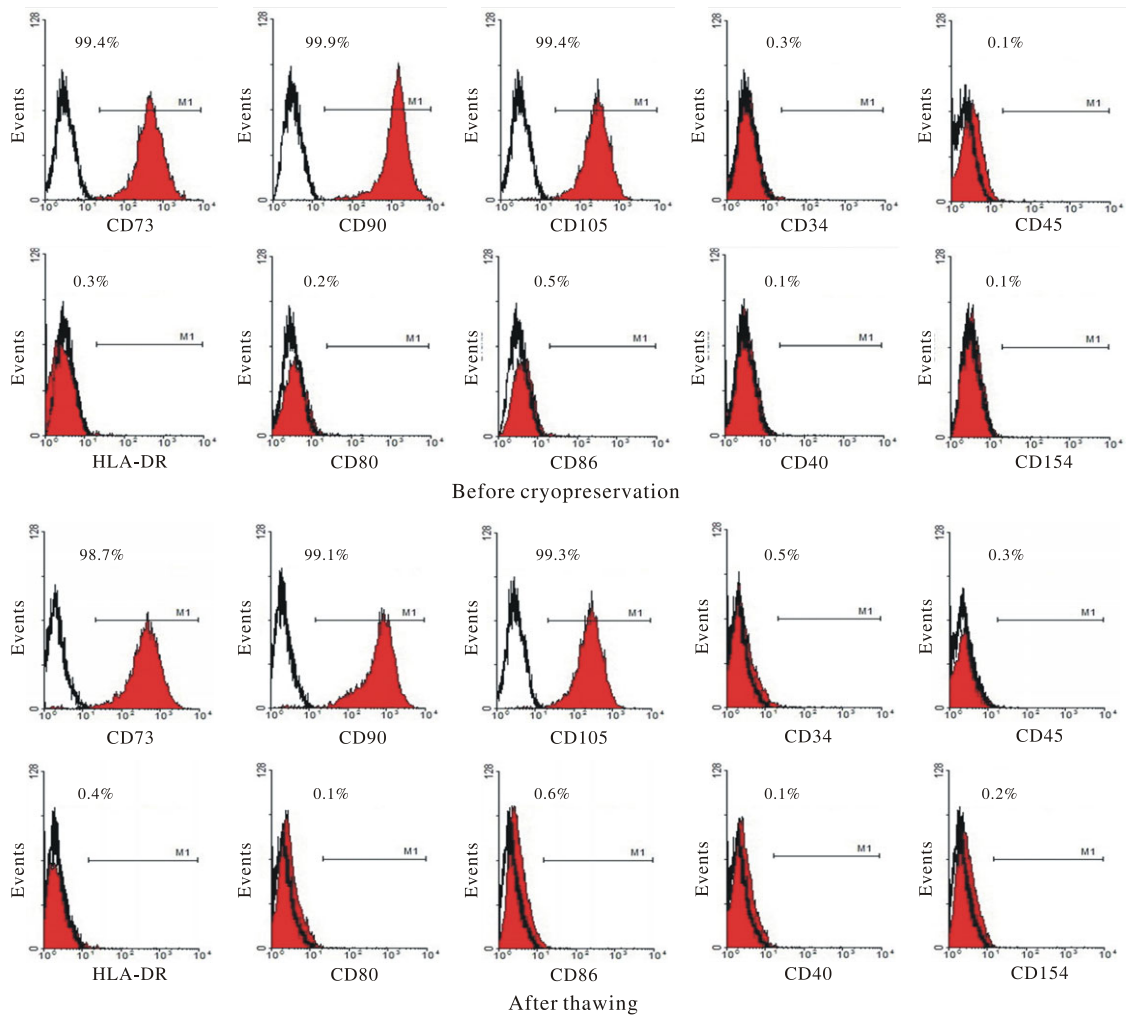


图 4 人脐带间充质干细胞冻存复苏前后的免疫表型
Fig 4 Immunophenotype of UC-MSC before cryopreservation and after thawing

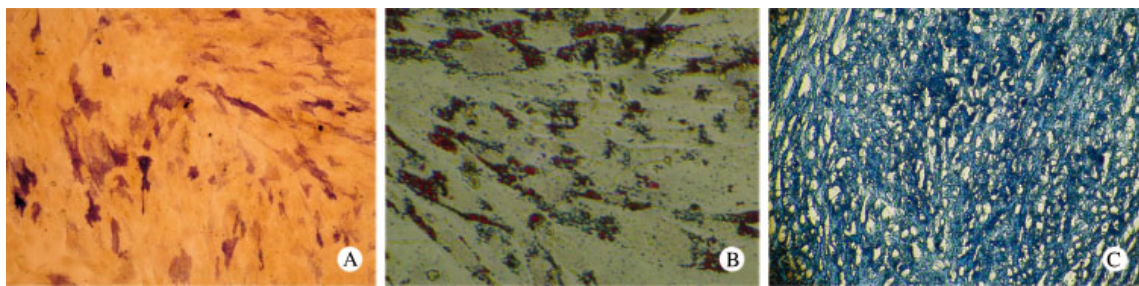


图 5 人脐带间充质干细胞冻存复苏后的多向诱导分化
Fig 5 Multi-directional differentiation of human UC-MSC into osteocytes stained with ALP (A), adipocytes stained with oil red O (B) and chondrocytes stained with alcian blue (C) after cryopreservation

的 UC-MSCs 在特定的诱导体系下仍能够向骨、脂肪和软骨分化，多向分化潜能未受影响。

综上所述，采用程控降温仪冷冻 UC-MSCs，并在液氮中保存 6 个月，对其生物学特性无影响，为 UC-MSCs 的临床保存及规模化储备提供了实验数据支持。

参考文献

1 Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics

[J] . Annu Rev Biomed Eng , 2010 , 12 :87-117.
2 Ning H , Yang F , Jiang M , et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients : outcome of a pilot clinical study [J] . Leukemia , 2008 , 22 (3) :593-599.
3 Abdel-Mageed AS , Senagore AJ , Pietryga DW , et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells genetically modified with extracellular superoxide dismutase improves survival in irradiated mice [J] . Blood , 2009 , 113 (5) :1201-1203.
4 Macdonald GI , Augello A , De Bari C. Role of mesenchymal stem cells in reestablishing immunologic tolerance in autoimmune rheumatic

表 2 院前急救发病时间分布比较 (例)

年度	时间											
	0:00-	2:00-	4:00-	6:00-	8:00-	10:00-	12:00-	14:00-	16:00-	18:00-	20:00-	22:00-
2009	483	433	382	635	865	697	630	910	633	454	715	725
2010	502	540	456	675	1 124	733	662	1 012	684	541	933	833
2011	544	516	499	697	1 178	776	715	1 156	724	580	1 098	922

主管护师等 30 余人。急救中心采用集中性院前指挥模式, 指挥调度 8 个市内医院的救护车及县医院救护车。在疾病谱调查前, 救护车在硬件设备上相对简单, 抢救设备与疾病谱不对应, 特别是针对创伤、重症心脑血管疾病, 救护车仅起到转运和完成简单救治功能, 院前急救功能未完全发挥。

结合疾病谱, 将 120 急救中心的 52 辆救护车按辖区、疾病特点予以装备, 重点调整救护车针对各种伤害、心脑血管疾病为主的硬件配备, 增加了负压骨折固定气垫、铲式担架, 方便创伤病员转运; 增加氧气瓶容量、心电监护除颤器、多参数监护仪、多导联心电图机、简易呼吸机、便携式呼吸机、心脏按压泵, 应对心脑血管疾病的紧急抢救^[5]。结合疾病谱, 120 医师队伍以加强创伤、心、脑血管疾病等专业为主, 强化止血、固定、包扎、搬运的专业技能训练, 强化针对心、脑血管疾病的急救救治演练, 提高专业技术水平。疾病谱显示市区多发交通伤、心脑血管疾病, 外县多发中毒、烧伤、电击伤等工业损伤, 在救护车设备和急救药品配置上各有侧重点, 充分体现了辖区差异。

结合急救患者发病时间分布, 对院前急救的高峰时段加强 120 出诊医生人数和出车数量的配备, 常规出诊的车辆为 36 辆, 其余车辆作为针对高峰时段和应急救治的预备车辆, 120 同时指挥调度县医院的常规救护车实施院前急救^[6], 动态调整人员、车辆、物资的使用, 保证高峰期患者的救治^[7]。

3 发展策略

现代医学模式给卫生服务管理思路带来了极为深远的影响, “如何通过更好的管理增进人群健康”构成了现代医学模式的管理内涵^[8]。通过急救疾病谱指导建立院前急救体系, 可合理评估医疗应急反应负荷, 储备应急力量, 匹配所需资源, 保障伤病员得到迅速有效救治^[9]。唐山市 120 急救中心通过加强对伤害、心脑血管疾病、脑血管疾病等重点疾病的救治, 合理配备急救资源, 完善救护车数量与硬件设备, 加强医生专业化培训^[10], 提高了院前急救向周边区和外县(市)的扩展能力, 更好地为人民群众健康保驾护航。

参考文献

- 1 陈辉, 张进军, 马隽, 等. 北京市院前急救反应能力现状调查 [J]. 军医进修学院学报, 2008, 29 (5) : 392-393 .
- 2 张文华, 李海风. 6758 例院前急救情况分析 [J]. 浙江预防医学, 2010, 22 (4) : 30-31 .
- 3 李学哲. 院前急救疾病谱临床分析 [J]. 临床医学, 2009, 29 (11) : 35-36 .
- 4 陈群谊, 叶巧亮, 柯美珍, 等. 车祸伤院前急救分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3 (19) : 114-115 .
- 5 侯世科, 樊毫军. 灾害医学救援中应把握的几个要点 [J]. 军医进修学院学报, 2010, 31 (3) : 280-281 .
- 6 马应伟, 吕琳, 赵春荣. 浅谈院前急救工作的防范与管理措施 [J]. 中国实用医药, 2010, 5 (17) : 255-256 .
- 7 马利平. 准确把握派车原则提高院前急救质量避免发生医疗纠纷 [J]. 中国医药指南, 2009, 7 (15) : 126-127 .
- 8 刘立军, 丁桂华, 王凤娟. 院前急救县域管理模式初探 [J]. 中国农村卫生事业管理, 2011, 31 (3) : 230-231 .
- 9 罗书练, 郑萍, 何新建, 等. 军队医院建立应急医学信息服务保障系统的意义 [J]. 军医进修学院学报, 2010, 31 (2) : 190-191 .
- 10 秦卫东. 专职化院前急救模式在急救医疗体系中的作用 [J]. 现代医院管理, 2011, 9 (1) : 43-44 .

(上接 1155 页)

- diseases [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63 (9) : 2547-2557 .
- 5 Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Asian J Transfus Sci, 2010, 4 (1) : 14-24 .
- 6 Carvalho KA, Cury CC, Oliveira L, et al. Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency [J]. Transplant Proc, 2008, 40 (3) : 839-841 .
- 7 杨雪良. 间充质干细胞的免疫学特性及其在异基因造血干细胞移植中的应用 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32 (8) : 873-875 .
- 8 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. Blood, 2005, 105 (4) : 1815-1822 .
- 9 周岗, 谢晓华, 杨靖, 等. 人骨髓间充质干细胞向汗腺细胞诱导培养中基因表达方式的研究 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32 (10) : 1055-1058 .
- 10 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4) : 315-317 .