·基础实验研究论著·

人脐带间充质干细胞不同冻存方法探讨

李正民，宫璀璀

（中国人民解放军第一五三中心医院检验科，郑州 450042）

摘　要：目的　观察不同冻存条件对人脐带间充质干细胞（HUC-MSC）冻存效果的影响。**方法**　将 HUC-MSC 传代培养增殖后，设立 4 个因素和 3 个水平，分为 9 个实验组，分别观察不同冻存条件下对各组 HUC-MSC 的存活率、回收率、免疫抗原 CD34 和 CD44 的影响。**结果**　第 9 组 HUC-MSC 解冻复苏后，其存活率、回收率以及免疫抗原 CD44 积分值均高于其他组（$P<0.01$），冻存前后其细胞形态无明显差别，细胞免疫抗原 CD34 均为阴性。**结论**　以 90％血清＋10％二甲基亚砜（DMSO）作为冻存液，取 10^6/mL 以下浓度的 HUC-MSC 放入厚壁聚乙烯泡沫盒中，立即封存置－80 ℃冻存 24 h，再投入液氮中冻存，为最佳冻存方法。

关键词：间质干细胞；　连续传代；　细胞培养技术；　低温保存；　正交试验

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.003　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)12-1414-03

Influence of different cryopreservation conditions on human umbilical cord mesenchymal stem cells

Li Zhengmin, Gong Cuicui

(*Department of Clinical Laboratory, No. 153 Central Hospital of People's Liberation Army, Zhengzhou, Henan* 450042, *China*)

Abstract: Objective　To explore the influence of different cryopreservation conditions on human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSC). **Methods**　HUC-MSC, after being proliferated, were divided into 9 experiment groups, according to 4 influencing factors and 3 levels. Survival rate, recovery rate and expression of immunizing antigen CD34 and CD44 of HUC-MSC, cryopreserved under different conditions, were observed. **Results**　The survival rate, recovery rate and integral value of HUC-MSC of the ninth experiment group were higher than those of the other groups ($P<0.01$). There was no influencing of cryopreservation on cellular morphous, and the expression of CD34 was negative. **Conclusion**　The optimal cryopreservation method of HUC-MSC might include 90% serum and 10% DMSO as freezing medium, concentration of MSC under 10^6/mL, thick-walled polyethylene foam box as container, and the treated procedure of immediate sealing, storing at －80 ℃ for 24 hours and then storing in liquid nitrogen.

Key words: mesenchymal stem cells;　serial passage;　cell culture techniques;　cryopreservation;　orthogonal test

人脐带间充质干细胞（HUC-MSC）是存在于脐带组织中的一种多能组织干细胞，能分化成多种组织细胞，具有高度的可塑性，是用于细胞移植和组织工程种子细胞的理想材料，具有广阔的临床应用前景[1-4]。

随着间充质干细胞临床应用的开展，对间充质干细胞的需求量增大，将间充质干细胞反复多次传代培养会导致细胞老化而失去分化能力，甚至增殖减慢致死亡[5]，因此需将大量的间充质干细胞传代培养增殖后，冻存起来，以备随时满足临床的需要。但是，选择间充质干细胞冻存方法恰当与否将影响冻存效果和临床工作的开展。本研究选取了培养 3 代的 HUC-MSC，选择 4 个主要影响冻存效果的因素进行比较，对比冻存实验前后以及冻存复苏后各组之间的活率、回收率、细胞免疫抗原 CD44 和 CD34、细胞形态的差异，报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　人脐带组织来自本院妇产科剖宫产足月新生儿，并经其父母授权同意；实验经本院伦理委员会批准。

1.2　仪器与试剂

1.2.1　仪器　二氧化碳恒温培养箱（美国 Thermo 公司）；超低温冰箱（中国海尔公司）；低温高速离心机（日本 Techcomp 公司）；倒置相差显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.2.2　试剂　达尔伯克改良伊格尔培养基（低糖）/F12 营养混合剂，即 DMEM/F12（Gibco 公司）；胎牛血清（FBS，Gibco 公司）；二甲基亚砜（DMSO，Sigma 公司）；0.25％胰酶（Sigma 公司）；台盼蓝（Chroma 公司）。

1.3　方法

1.3.1　HUC-MSC 的分离、培养及传代方法　组织块贴壁法[6-8]：将人脐带在无菌条件下浸入 DMEM/F12 培养液中，置 4 ℃保存。于层流培养室超净工作台上取出脐带，放入无菌培养皿中，加入 DMEM/F12 培养液，用镊子剔去血液等附着物，洗净，移至另一培养皿内，用手术刀或小剪刀将脐带切成 1～1.5 mm^3 大小组织块，用吸管将小块组织均匀地散在 25～30 cm^2 的培养瓶底部。加入含有 10％ PBS 的 DMEM/F12 培养液，置 37 ℃、5％ CO_2 的孵育箱中培养。7 d 时在倒置显微镜下观察生长情况，用吸管吸出周围已长有许多细胞的组织块，继续培养，待细胞达到最大密度时进行消化传代，视细胞密度可 1 瓶传代至 2～3 瓶。把经传代培养（一般在 5 代以内）增殖后的 HUC-MSC 用胰酶消化后收集起来，按照实验要求分成 10^5、10^6、10^7/mL 浓度各 3 管共 9 管，分别按实验要求进行冻存。

1.3.2　HUC-MSC 不同冻存条件实验分组　将 HUC-MSC 传代培养后，采用正交试验 $L9(3_4)$ 分成 9 组不同冻存条件进行冻存，共分为 4 个因素（冻存液、冻存温度、冻存细胞数、冻存天数）、3 个水平（即每一个因素分为 3 个水平）。然后，以相同方法解冻复苏细胞，比较 9 组细胞的存活率、回收率、细胞形态

及细胞免疫抗原 CD44、CD34 的差异，见表 1。

表 1　各组不同冻存条件实验表

试验分组	Ⅰ/A 冻存液	Ⅱ/B 冻存温度	Ⅲ/C 冻存细胞浓度(/mL)	Ⅳ/D 冻存时间(d)
1 组	a	T1	10^5	7
2 组	a	T2	10^6	14
3 组	a	T3	10^7	28
4 组	b	T1	10^6	28
5 组	b	T2	10^7	7
6 组	b	T3	10^5	14
7 组	c	T1	10^7	14
8 组	c	T2	10^5	28
9 组	c	T3	10^6	7

a：20％血清＋10％DMSO＋70％DMEM/F12 培养基；b：50％血清＋10％DMSO＋40％DMEM/F12 培养基；c：90％血清＋10％DMSO；T1：放 4 ℃ 30 min，然后放－20 ℃ 2 h，再放－80 ℃ 24 h，再投入液氮中；T2：放 4 ℃ 30 min，然后放－20 ℃ 2 h，再放－80 ℃ 24 h；T3：放入厚壁聚乙烯泡沫盒中，立即封存后置－80 ℃ 24 h，再投入液氮中。

1.3.3　HUC-MSC 的复苏　各组采用相同的复苏方法进行复苏。将冻存细胞取出后立即放入 40 ℃恒温水浴箱中，使其在 1 min 内快速复苏，然后将细胞移入离心管中，加入 DMEM/F12 培养基，吸打混合均匀，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清后，再用 PBS 洗涤 2 次，最后用 1 mL PBS 制成细胞混悬液。

1.3.4　检测指标　(1)活率：将 50 μL HUC-MSC 用 0.4％台盼蓝 50 μL 染色 3～5 min 后，用血细胞计数板计数未被染成蓝色细胞数占总细胞数的百分比，即为细胞活率。(2)回收率：冻存后收集的细胞数占冻存前细胞总数的百分比，即为回收率。(3)免疫抗原 CD44、CD34 检测及积分值：将细胞滴片后，应在有效保存时间内(一般不超过 36 h)尽快完成 CD44、CD34 检测[9]。信号显色时，每个标本观察 100 个以上细胞，按其信号的强弱分为±、＋、＋＋ 3 级，分别计 1、2、4 分，计算出总积分值。(4)细胞形态：观察冻存前后细胞形态的变化以及冻存后各组之间的细胞形态差异。

2　结　　果

2.1　各组细胞的活率及回收率　见表 2。

表 2　各组细胞活率及回收率的比较(％)

项目	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组	6 组	7 组	8 组	9 组
冻存前活率	99	98	98	98	98	99	98	99	98
冻存后活率	91	90	92	94	88	92	88	94	97
回收率	93	90	61	92	69	90	73	91	95

2.2　各组细胞免疫抗原 CD44 积分值　见表 3。

2.3　各组细胞免疫抗原 CD34　各组细胞冻存前后做免疫组化检测 CD34 均为阴性，说明此次实验细胞不是造血干细胞($CD34^+$)，而是间充质干细胞($CD44^+$)。

2.4　细胞形态　将 HUC-MSC 解冻复苏后，贴壁培养数日，形成相对均一的成纤维细胞样、平行排列或漩涡生长的细胞即为 HUC-MSC[10]。经显微镜观察，HUC-MSC 冻存前后无明显形态变化；冻存后各组之间无明显形态差异，冻存后未发现细胞形态变异现象。第 9 组细胞冻存前后照片见图 1～2。

表 3　各组细胞 CD44 积分值的比较

组别	计算细胞数(n)	免疫组化信号分级(n)			总积分	P 值
		±	＋	＋＋		
1 组	100	46	49	5	164	＞0.05
2 组	100	38	60	2	166	＞0.05
3 组	100	45	53	2	159	＞0.05
4 组	100	49	50	1	153	＞0.05
5 组	100	14	80	6	198	＜0.05
6 组	100	45	52	3	161	＞0.05
7 组	100	63	35	2	141	＞0.05
8 组	100	53	45	2	151	＞0.05
9 组	100	27	49	24	221	＜0.01
冻存前对照	100	11	58	31	251	

－：无数据。

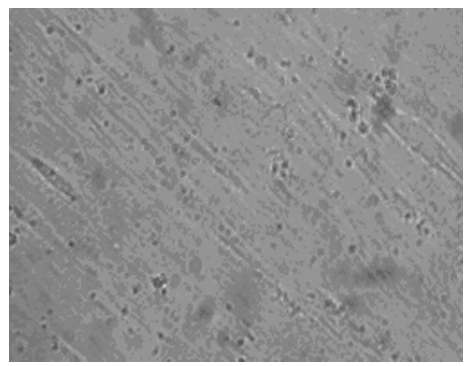


图 1　第 9 组 HUC-MSC 冻存前(TUNEL，×200)

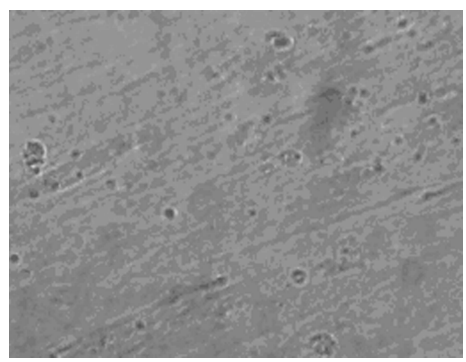


图 2　第 9 组 HUC-MSC 冻存后(TUNEL，×200)

3　讨　　论

细胞在传代培养过程中，传代到一定的代数易出现老化、自发分化、形态改变、变异、自然死亡等现象[11-12]，为满足临床应用对间充质干细胞的需要，笔者对 HUC-MSC 的几种冻存方法进行了实验探讨。此次实验的冻存液组成中均加入了 DMSO 作为冷冻保护剂，DMSO 在溶液中与水分子发生水合作用，使溶液的黏度增加，冰点降低，延缓冷冻过程，从而使细胞逐渐地适应温度的变化，减少细胞的损伤；DMSO 还可以进入细胞以提高细胞内的离子浓度，平衡细胞内外渗透压，降低细胞脱水的速度和程度。本实验用的细胞均采用第 3 代传代培养的 HUC-MSC。

实验结果表明，第 9 组 HUC-MSC 冻存方法为最佳方法，即使用 90%血清＋10%DMSO 为冻存液，将细胞配成 10^6/mL 的浓度置于厚壁聚乙烯泡沫盒中，立即封存置－80 ℃ 24 h，再投入液氮中冻存。目前公认的最佳降温速率为－1 ℃/min，而在分阶段降温过程中，特别是－20～4 ℃区间，细胞最易受损[13]。第 9 组细胞置于厚壁聚乙烯泡沫中直接放入－80 ℃冰箱冻存，其降温速率接近于最佳降温速率，故而活率、回收率及 CD44 积分值为最佳，经统计学分析，9 组细胞中仅第 9 组 $P<0.01$，差异非常显著。

本次实验冻存复苏后，活率最差组为第 5、7 组，均为 88%；回收率最差组为第 3、5、7 组，分别为 61%、69%、73%。分析第 3、5、7 组冻存方法，其共同点为均采用 10^7/mL 的冻存浓度，可以看出 HUC-MSC 的冻存细胞浓度大于或等于 10^7/mL 时影响冻存效果。而采用 10^5、10^6/mL 的细胞冻存浓度冻存，复苏后所得细胞活率和回收率均大于或等于 90%。据此分析 HUC-MSC 的冻存细胞浓度大于或等于 10^7/mL 时，冻存后对细胞的活率和回收率有较大影响，冻存效果较差。

实验结果还表明，冻存效果相对较好的第 1、2、4、6、8、9 组的细胞活率和回收率都在 90%以上。说明除了冻存细胞浓度因素外，不同的冻存液、冻存温度、冻存时间等因素对细胞的冻存效果没有较大的、较为明显的影响。

此外，冻存实验前后，HUC-MSC 的免疫抗原 CD44 均显色为阳性，CD34 均为阴性，说明 HUC-MSC 的冻存不改变细胞的免疫抗原 CD44 和 CD34，冻存后的 HUC-MSC 依然能够保持其原有的免疫学表面抗原标志 $CD44^+$；但各组之间不同的冻存方法，其 CD44 积分值均较冻存前有所降低，部分组 HUC-MSC 的 CD44 信号强度有所减弱，由此说明 HUC-MSC 的冻存会降低部分细胞的 CD44 信号强度。9 组细胞 CD44 积分值经统计学分析，第 1、2、3、4、6、7、8 组间差异无统计学意义（$P>0.05$），表现为积分值全部降低较多；第 5 组积分值略增高（$P<0.05$）；第 9 组在 9 组中积分值最高（$P<0.05$），采用第 9 组冻存方法的 HUC-MSC CD44 积分值为 221，其积分值最接近冻存前的间充质干细胞 CD44 信号强度（积分值为 251）。说明第 9 组细胞所采用的冻存方法能够相对较好地保持间充质干细胞原有的 CD44 信号强度，该组冻存方法为最佳冻存方法。

依据实验结果，笔者认为使用 90%血清＋10%DMSO 作为冻存液，将细胞配成 10^6/mL 及以下浓度置于厚壁聚乙烯泡沫盒中，立即封存置－80 ℃ 24 h，再投入液氮中冻存为最佳冻存方法。选择合适的冻存方法是保证冻存效果的关键所在。对间充质干细胞冻存方法的单一影响因素研究较多，但对于多因素多水平的研究较少，此实验为 HUC-MSC 冻存方法的比较和选择提供了实验依据。

参考文献

[1] Guo L, Ying F, Meng HQ, et al. Differentiation of mesen chymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro[J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18(1): 36-42.

[2] 沈华. 脐带间充质干细胞的研究进展[J]. 中国美容医学, 2009, 16(8): 1158-1160.

[3] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(1): 8-15.

[4] 孟强，赵树铭. 提高脐血造血干细胞移植归巢的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 366-368.

[5] Baksh D, Song I, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cell: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy [J]. J cell Mol Med, 2004, 8(3): 301-316.

[6] 刘民培，郭晓钟，李亚东. 现代临床实验研究技术[M]. 北京：清华大学出版社, 2008.

[7] 张炳强，于丽，石娟，等. 人脐带间充质干细胞分离培养方法的优化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(2): 123-127.

[8] 袁源，杨树源，韩忠朝，等. 人脐带间充质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 23(1): 118.

[9] 宋建新，朱红艳，蒋雅光，等. 骨髓标本放置时间对流式细胞术白血病免疫分型检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 391-392.

[10] 窦慧慧，郭文君，于丽，等. 人脐带间充质干细胞分离培养方法的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(2): 186-189.

[11] Tiu R, Gondek L, O'keefe C, et al. Clonality of the stem cell compartment during evolution of myelodyspastic syndromes and other bone marrow failure syndromes[J]. Leukemia, 2010, 21(8): 1648-1657.

[12] Campaynoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem cells in human first trimester fetal blood, and bone marrow[J]. Blood, 2010, 98(8): 2396-2402.

[13] 雷从民，孟沛霖. 小鼠骨髓造血干细胞冷冻损伤的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 10(6): 289-291.

（收稿日期：2011-11-04）

（上接第 1413 页）

activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis [J]. Brain, 2005, 128(Pt 5): 988-1002.

[10] Veldhoen M, Stockinger B. TGFβ1, a 'Jack of all trades': the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells[J]. Trends Immunol, 2006, 27(8): 358-361.

[11] He R, Oyoshi MK, Jin H, et al. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(40): 15817-15822.

[12] Perrier C, Thierry AC, Mercenier A, et al. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice [J]. Clin Exp Allergy, 2010, 40(1): 153-162.

（收稿日期：2012-04-23）