· 临床检验研究论著 ·

# 临床治疗用人骨髓间充质干细胞保存条件的研究*

陈　京，季明芳，李晓玲，方慧云，余元龙，程伟民△
（中山大学附属中山医院肿瘤研究所，广东中山 528403）

**摘　要：目的**　探讨不同输注液、保存时间及温度对临床治疗用人骨髓间充质干细胞（hBMSCs）存活率、表型及增殖能力等状况的影响。**方法**　采用密度梯度离心法从人骨髓分离培养 hBMSCs，流式细胞术检测细胞表型，并进行成骨、成脂等多向分化能力鉴定。在 4 ℃和 25 ℃条件下，将培养的第 3 代 hBMSCs 保存在 3 种临床常用输注液（9 g/L 氯化钠注射液、5%人血清清蛋白氯化钠注射液、50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液）中，检测 hBMSCs 在不同时间点（0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h）的细胞存活率、细胞表型和存活细胞的增殖能力。**结果**　hBMSCs 间充质干细胞形态为均一的长梭形，表达 CD29、CD105，不表达 CD34。成脂诱导 2 周，油红 O 染色，可见脂滴为红色。成骨诱导 3 周，茜素红 S 染色可见大量橘红色钙结节。4 ℃和 25 ℃条件下，保存不同时间后，5%人血清清蛋白氯化钠注射液组细胞存活率和增殖能力均高于其余 2 组。同一组细胞 4 ℃条件下保存不同时间后的增殖能力强于 25 ℃条件下保存的细胞。不同输注液、保存温度及保存时间对细胞表型没有显著影响。**结论**　4 ℃条件下，将间充质干细胞保存在 5%人血清清蛋白氯化钠注射液中 0.5 h 内回输对细胞活力影响最小。

**关键词：**间充质干细胞；　存活率；　增殖能力
**DOI：**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.009　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)12-1542-03

## Influence of preservation conditions on human mesenchymal stem cells*

*Chen Jing, Ji Mingfang, Li Xiaoling, Fang Huiyun, Yu Yuanlong, Cheng Weimin*△
(*Cancer Research Institution, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong* 528403, *China*)

**Abstract: Objective**　To investigate the impact of different infusions, storage time and temperature on survival rate, phenotype and proliferative capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs). **Methods**　hBMSCs, isolated from human bone marrow by using density gradient centrifugation, were cultured and detected for surface markers by flow cytometry and multi-directional differentiation potential by adipogenic and osteogenic induction. The third-generation of hBMSCs was preserved using 3 kinds of common infusion solutions, including 9 g/L sodium chloride injection, 9 g/L sodium chloride injection containing 5% human albumin, and 50 g/L glucose and sodium chloride injection. After preserved at 4 and 25 ℃ for 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 hours, cell survival rate, phenotype and proliferative capacity were determined. **Results**　hBMSCs were uniform long spindle, with positive expression of CD29 and CD105, and negative expression of CD34. After 2 weeks of adipogenic induction, oil red O staining showed red-stained lipid droplets. After 3 weeks of osteogenic induction, alizarin red S staining showed orange calcium nodules. At 4 and 25 ℃, the survival rate and proliferative capacity of hBMSCs, preserved in infusion solution prepared by human albumin were much higher than hBMSCs preserved in the other two kinds of infusion solutions. Proliferative capacity of hBMSCs preserved at 4 ℃ was much higher than those preserved at 25 ℃. Different infusion, temperature and storage time had no significant effect on cell phenotype. **Conclusion**　Preservation condition of 4 ℃ and 9 g/L sodium chloride injection containing 5% albumin might be with minimal impact on cell viability of hBMSCs.

**Key words:** mesenchymal stem cells;　survival rate;　proliferative capacity

人骨髓间充质干细胞（hBMSCs）是来源于中胚层的多能干细胞，具有免疫调节、自我更新、多向分化等生物学特性，这些特性使其成为组织工程和临床治疗研究的热点[1-3]。在实验室制备好干细胞注射液运送到临床输注的过程中，如何最大限度保证细胞活力是临床至关重要的问题。本试验依据目前临床应用的现有条件，探讨了不同输注液、保存时间及温度对干细胞存活率和增殖能力等生物状况的影响，为提高 hBMSCs 在临床上的疗效提供实验室数据。

## 1　资料与方法

**1.1**　一般资料　健康志愿者骨髓由中山市人民医院提供。提供骨髓志愿者对试验均知情同意。

**1.2**　仪器与试剂　二氧化碳恒温培养箱（美国 Thermo 公司）；倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；流式细胞仪（美国 Beckman 公司）；L-DMEM 培养基（Hyclone 公司）；胎牛血清（Hyclone 公司）；9 g/L 氯化钠注射液、50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液（上海百特医疗用品有限公司）；人血清清蛋白（Grifols 公司）；PE 标记鼠抗人 CD29、CD34 和 CD105 单克隆抗体（美国 Beckman 公司）。

**1.3**　方法

**1.3.1**　分离培养 hBMSCs　在志愿者髂前上棘抽取骨髓 10 mL。采集的骨髓用生理盐水 1∶1 稀释，密度为 1.077 g/L 的淋巴细胞分离液 2 000 r/min 离心 15 min，收集白膜层，生理盐水漂洗 2 次。以含 10% FBS 的 L-DMEM 作为完全培养液，以一定密度接种于 75 mL 培养瓶中，置于 37 ℃，5% $CO_2$ 饱和湿度培养箱内培养，3 d 后换液去除非贴壁细胞，以后每 2～3 d 换液 1 次，待细胞达 80%融合时，用 0.25%胰酶＋0.02% ED-

*　**基金项目：**中山市科技计划重大项目（20113A001）。　作者简介：陈京，女，检验技师，主要从事肿瘤学基础研究。　△　通讯作者，E-mail：williamch_99@sina.com。

TA 消化,以 1∶3 的比例传代培养。

**1.3.2　流式检测 hBMSCs 表型**　hBMSCs 用 0.25%胰酶+0.02% EDTA 消化,1 000 r/min 离心 5 min,生理盐水洗涤,制备成 $1\times10^6$/mL 单细胞悬液,分别加入荧光标记的鼠抗人 CD34、CD29、CD105 抗体,设置空白对照,避光冰育 30 min,生理盐水洗涤 3 次后重悬细胞,上流式细胞仪检测。

**1.3.3　鉴定 hBMSCs 多向分化潜能**　以 $4\times10^3$/cm$^2$ 密度将第 3 代 hBMSCs 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。(1)成脂诱导及鉴定:细胞达到完全融合后 4 d,实验组加入脂肪诱导液(H-DMEM,10% FCS,0.5 mmol/L IBMX,10 μg/mL 牛胰岛素,0.2 mmol/L indomethacin,1 μmol/L 地塞米松)诱导 3 d,再用脂肪保持液(H-DMEM,10 μg/mL 牛胰岛素,10% FCS)处理 1 d,循环 3 次,再用脂肪保持液处理 2 d。对照组加入含 10% FCS 的 H-DMEM,每 3 天换液 1 次。2 周后油红 O 染色鉴定。(2)成骨诱导及鉴定:细胞达到 60%～70% 融合后,实验组加入成骨细胞诱导液(OS,含 $1\times10^{-7}$ mol/L 地塞米松,10 mmol/L 甘油磷酸钠,50 g/mL 维生素 C),对照组加入 L-DMEM 完全培养液,置培养箱中,每 2 天换液 1 次,第 21 天终止诱导。茜素红 S 染色鉴定。

**1.3.4　分组处理 hBMSCs**　采用 0.25%胰酶+0.02%EDTA 消化 hBMSCs,用不同输注液制备单细胞悬液。根据输注液不同分为生理盐水组(9 g/L 氯化钠注射液)、糖盐组(50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液)、清蛋白组(含 5%人血清蛋白的氯化钠注射液)。分别在 4 ℃和 25 ℃温度条件下置于不同时间点(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h)后进行以下检测。(1)取 90 μL 细胞悬液与 10 μL 胎盘蓝混匀,3 min 内计数活细胞(未染色)和死细胞(染色),测定细胞存活率。(2)另取 $1\times10^6$/mL 细胞行流式细胞术检测细胞表型 CD34、CD29、CD105。(3)再将不同分组细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,采用含 10% FBS 的 L-DMEM 作为完全培养液,以 $1\times10^3$/mL 密度接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,置于 37 ℃,5% $CO_2$ 饱和湿度培养箱培养 7 d。采用 CCK-8 在酶联免疫检测仪上测定 450 nm 各孔波长吸光度(A)值,以时间为横轴,A 值为纵轴绘制生长曲线。

**1.4　统计学处理**　采用 SPSS17.0 进行数据分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 $t$ 检验进行两组均数间比较,采用单因素方差分析进行多组均数间比较,采用 $LSD$ 最小显著差数法进行均数间两两比较。$P<0.05$ 表示差别有统计学意义。

## 2　结　　果

**2.1　hBMSCs 形态观察**　原代 hBMSCs 贴壁后,呈圆形,散在分布。3 d 后完全换液,去除未贴壁细胞,可见少量分散短梭形贴壁细胞。第 14 天时,贴壁细胞融合成单层,细胞排列有明显方向性,呈漩涡状。见图 1。

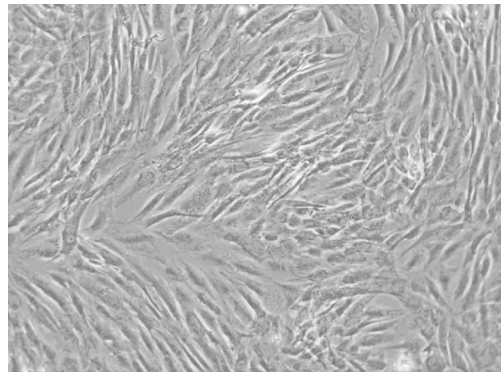

**图 1　人骨髓间充质干细胞形态(光学显微镜,200×)**

**2.2　hBMSCs 的表型**　流式检测第 3 代 hBMSCs 的表型发现,CD105 阳性率 98.7%,CD29 阳性率 97.7%,表达率极高;CD34 阳性率为 2.9%,表达呈阴性。

**2.3　hBMSCs 分化能力鉴定**　hBMSCs 成脂诱导 2 周后,光学显微镜下可见大量融合成串珠状的圆形脂滴。油红 O 染色可见被染成橙红色的脂滴,显示分离的 hBMSCs 可被诱导向脂肪细胞分化。成骨诱导 3 周,细胞逐渐融合,失去细胞结构,14 d 左右出现明显钙结节,茜素红 S 染色后可见散在大量橘红色钙结节,显示培养的 hBMSCs 可被诱导向成骨细胞分化。

**2.4　hBMSCs 存活率检测**　在 5 个时间点(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h)对保存在 25 ℃、4 ℃的 3 个实验组的细胞存活率检测,结果见表 1～2。结果显示,糖盐组细胞存活率最低,25 ℃保存 4.0 h 时只有约 10%细胞存活;而清蛋白组细胞存活率最高,25 ℃保存 2.0 h 时清蛋白组细胞存活率仍可达 90%,差异有统计学意义($P<0.05$)。25 ℃和 4 ℃条件下,保存 0.5 h 时,生理盐水组及清蛋白组细胞存活率都超过 90%,随着保存时间延长,各组细胞存活率逐渐下降。

**表 1　25 ℃条件下分组处理后 hBMSCs 存活率比较(%,$\bar{x}\pm s$)**

| 分组 | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 4.0 h | 6.0 h |
|---|---|---|---|---|---|
| 生理盐水组 | 95.3±1.2* | 80.1±2.7*△ | 71.4±1.5*△ | 56.8±1.4*△ | 45.2±2.2* |
| 清蛋白组 | 98.1±0.7* | 90.2±1.8*△ | 86.2±1.6*△ | 74.2±1.3*△ | 60.3±2.1*△ |
| 糖盐组 | 80.2±2.6 | 42.5±1.8△ | 21.4±0.9△ | 10.2±0.7△ | 0.8±0.4△ |

*:$P<0.05$,与糖盐组比较。△:$P<0.05$,与 0.5 h 比较。

**表 2　4 ℃条件下分组处理后 hBMSCs 存活率比较(%,$\bar{x}\pm s$)**

| 分组 | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 4.0 h | 6.0 h |
|---|---|---|---|---|---|
| 生理盐水组 | 97.2±1.5* | 90.5±2.2*△ | 83.1±0.4*△ | 78.2±0.1*△ | 65.1±1.3*△ |
| 清蛋白组 | 99.1±0.4* | 95.6±1.5*△ | 92.3±0.5*△ | 82.3±1.9*△ | 73.7±0.3*△ |
| 糖盐组 | 85.1±2.4 | 63.3±1.3△ | 32.1±0.4△ | 15.2±0.7△ | 1.2±0.3△ |

*:$P<0.05$,与糖盐组比较。△:$P<0.05$,与 0.5 h 比较。

**2.5　不同分组细胞表型检测**　25 ℃和 4 ℃条件下,在 5 个时间点(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h)对 3 个实验组的细胞表型检测,结果见表 3～5。结果表明,不同输注液、保存温度及保存时间对细胞表型影响差异无统计学意义($P>0.05$)。

**2.6　细胞生长曲线测定**　将不同分组处理后的细胞，采用 L-DMEM 完全培养液重新接种培养，检测细胞增殖能力，结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液组保存的细胞增殖能力最差，保存 4 h 后细胞失去贴壁和生长能力(无细胞贴壁无法完成生长曲线)。5%人血清清蛋白氯化钠注射液组细胞增殖能力比 9 g/L 氯化钠注射液组细胞增殖能力强。同一组细胞 4 ℃条件下不同时间点的增殖能力比 25 ℃条件下强。随着保存时间延长，各组细胞增殖能力逐渐下降。

**表 3　9 g/L 氯化钠注射液在 4 ℃和 25 ℃条件下保存不同时间后细胞表型比较(%，$\bar{x}\pm s$)**

| 时间(h) | 4 ℃ | | | 25 ℃ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD105 | CD29 | CD34 | CD105 | CD29 | CD34 |
| 0.5 | 97.7±1.5 | 98.7±1.2 | 2.9±0.3 | 97.5±1.1 | 98.6±1.3 | 2.2±0.4 |
| 1.0 | 97.3±1.3 | 97.6±1.1 | 7.9±0.6 | 96.3±1.5 | 97.7±1.2 | 2.4±0.6 |
| 2.0 | 97.4±1.6 | 98.6±1.5 | 2.2±0.4 | 95.7±1.2 | 97.4±1.6 | 2.9±0.5 |
| 4.0 | 97.0±1.2 | 98.3±1.3 | 4.5±0.1 | 95.3±1.4 | 97.0±1.9 | 2.5±0.3 |
| 6.0 | 97.6±1.7 | 97.2±1.6 | 5.1±0.2 | 92.9±1.1 | 95.8±1.3 | 2.6±0.4 |

**表 4　含 5%人血清清蛋白氯化钠注射液在 4 ℃和 25 ℃条件下保存不同时间后细胞表型比较(%，$\bar{x}\pm s$)**

| 时间(h) | 4 ℃ | | | 25 ℃ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD105 | CD29 | CD34 | CD105 | CD29 | CD34 |
| 0.5 | 96.2±1.2 | 97.8±1.1 | 2.4±0.3 | 96.7±1.6 | 98.4±1.1 | 2.1±0.5 |
| 1.0 | 96.5±1.4 | 98.2±1.6 | 0.9±0.6 | 95.6±1.3 | 98.0±1.2 | 2.7±0.1 |
| 2.0 | 96.0±1.3 | 97.5±1.4 | 2.1±0.1 | 94.5±1.6 | 97.7±1.8 | 2.7±0.3 |
| 4.0 | 89.8±1.3 | 93.3±1.1 | 4.1±0.4 | 92.1±1.7 | 96.8±1.3 | 2.1±0.8 |
| 6.0 | 93.5±1.6 | 96.7±1.7 | 3.1±0.2 | 91.8±1.0 | 96.6±1.2 | 2.3±0.6 |

**表 5　50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液在 4 ℃和 25 ℃条件下保存不同时间后细胞表型比较(%，$\bar{x}\pm s$)**

| 时间(h) | 4 ℃ | | | 25 ℃ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD105 | CD29 | CD34 | CD105 | CD29 | CD34 |
| 0.5 | 97.7±1.6 | 98.8±1.0 | 1.9±0.3 | 97.3±1.9 | 98.5±1.6 | 2.1±0.9 |
| 1.0 | 97.9±1.7 | 99.2±1.3 | 1.4±0.6 | 97.3±1.2 | 98.7±1.4 | 2.6±0.6 |
| 2.0 | 98.4±1.6 | 99.5±1.4 | 2.6±0.4 | 98.1±1.4 | 97.1±1.5 | 1.9±0.5 |

## 3　讨　　论

hBMSCs 是来源于骨髓的间质干细胞，不仅能分化成肝细胞、胆管上皮细胞[4]、血管内皮细胞[5]、不同类型的皮肤细胞[6]、神经样[7]细胞，还具有免疫调节、炎症趋化等特性，使其在肝脏疾病、血管外科、烧伤整形外科及神经损伤等疾病治疗中发挥越来越重要的作用。干细胞注射液从实验室制备到运送至病房回输给患者具有一定时空距离，特别是随着异地移植病例的增多，如何有效地保存干细胞注射液，对于细胞移植的临床应用非常重要。目前相关研究更多集中于将干细胞冷冻于－80 ℃或液氮等进行长期保存的探讨[8-9]，有关短时保存条件对干细胞生存和生长影响的研究不多。本实验探讨了几种临床常用注射液在不同温度下短时保存干细胞对细胞存活率和增殖能力等状况的影响。

形态学观察显示，培养的细胞呈均一长梭形，辐射状生长；流式细胞术检测细胞表型显示 CD34 表达阴性，CD29、CD105 表达阳性；成脂诱导后出现大量脂滴，成骨诱导后出现钙结节，表明该细胞确为 hBMSCs。

通过 3 种注射液比较结果显示，在同等温度和时间条件下，50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液对细胞活力影响最大，可能与细胞利用葡萄糖产生大量乳酸加重细胞损伤有关；能为细胞提供营养物质的 5%人血清清蛋白氯化钠注射液对细胞活力影响最小。考虑到输注液对细胞活力的影响，建议使用含 5%人血清清蛋白氯化钠注射液作为输注液，如患者不宜使用，可选择使用 9 g/L 氯化钠注射液，但不宜使用 50 g/L 葡萄糖氯化钠注射液作为输注液。2 种温度比较结果显示，4 ℃保存对细胞增殖能力的影响更小，可能相对低温可以降低细胞代谢速度，延缓其凋亡。用于临床治疗的 hBMSCs 注射液室温保存最好不要超过 1.0 h，不能及时回输时需存放在 4 ℃，但也不要超过 2.0 h。将干细胞保存在上述几种注射液中，随着保存时间延长，其存活率、贴壁及增殖能力均显著下降，可能与注射液营养成分及生长因子等细胞生长所需要的条件缺乏有关。不同输注液、保存温度及保存时间对细胞表型影响差异无统计学意义($P>0.05$)，表明不同保存条件不会引起细胞表面物质的脱落，仅引起细胞凋亡。

综上所述，临床常用注射液对细胞活力影响较大，hBMSCs 一旦制备成细胞注射液，应尽可能保存在 4 ℃，及时运送至临床回输给患者，这样才能保持细胞活力，满足临床需要。

## 参考文献


[1] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(10): 1226-1238.

[2] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression[J]. Bio Med Sci, 2005, 12(1): 47-57.

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

[4] Kushida T, Inaba M, Hisha H, et al. Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in mrl/lpr mice by bmt via portal vein[J]. Stem cells, 2001, 19(3): 226-235.

[5] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines[J]. Circulation, 2001, 104(9): 1046-1052.

[6] Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al. Participation of bone marrow derived cell in cutaneous wound healing[J]. Cell Physiol, 2003, 196(2): 245-250.

[7] Bae KS, Park JB, Kim HS, et al. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(3): 401-412.

[8] 李秀森，范海涛，原野，等. 人骨髓间充质干细胞原位冷冻保存方法的改进[J]. 中国实验血液学杂志，2003，11(5)：530-533.

[9] 梁翠铭，黄敏. 人干细胞的采集分离和保存及临床应用[J]. 检验医学与临床，2007，12(4)：1192-1193.


(收稿日期：2014-01-09)