

文章编号 1006-8147(2021)06-0618-05

论著

脐带采集液中抗生素的合理选择

史丽^{1,2}, 郁春艳¹, 李岩¹, 许现辉³, 杨栋林³, 沈洋洋¹, 邓为民¹

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系, 国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070; 2.协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300384; 3.中国医学科学院血液学研究所血液病医院, 天津 300020)

摘要 目的: 了解脐带采集过程中脐带污染菌的种类, 为脐带采集液中合理添加抗生素提供实验依据。方法: 采用 BacT/Alert 3D240 培养系统进行微生物培养; 采用梅里埃 API 鉴定系统鉴定菌种; 采用 ATB 药敏系统进行药敏试验; 采用油红 O 染色和茜素红染色, 测定人脐带组织间充质干细胞(HUCMSCs)的成脂分化和成骨分化潜能。结果: 采集 1 562 份脐带, 微生物培养阳性的 386 份脐带采集液共检出细菌及真菌 438 株, 其中革兰阴性菌 193 株(44.1%), 主要为大肠埃希氏菌, 其对头孢西丁的敏感率为 90.3%; 革兰阳性菌 210 株(48.0%), 主要为肠球菌, 其次是葡萄球菌和链球菌, 三者对青霉素的敏感率分别为 93.1%、19.7%、92.9%; 真菌 35 株(8.0%), 主要为白假丝酵母菌, 真菌对两性霉素 B 的敏感率为 100%。进一步的结果显示, 与对照组比较, 头孢西丁、青霉素、两性霉素 B 和三者混合使用对 HUCMSCs 生长、增殖和多向分化均无影响($P>0.05$)。结论: 脐带采集污染优势菌株依次为大肠埃希菌、粪肠球菌、白假丝酵母菌; 脐带采集液中加入头孢西丁、青霉素和两性霉素 B 可以显著减少细菌和真菌污染。

关键词 脐带采集污染; 菌群分布; 抗生素; 人脐带间充质干细胞

中图分类号 R378+R379

文献标志码 A

Added rational antibiotics in umbilical cord preservation fluid

SHI Li^{1,2}, YU Chun-yan¹, LI Yan¹, XU Xian-hui³, YANG Dong-lin³, SHEN Yang-yang¹, DENG Wei-min¹

(1.Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Diseases and Microenvironment of Ministry of Education of China, Tianjin 300070, China; 2. Union Stem Cell & Gene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China; 3. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Objective: To identify the microbial species contaminated during collection of umbilical cord and to provide experimental basis for adding rational antibiotics in umbilical cord preservation fluid. **Methods:** The microbia were cultivated by BacT/Alert 3D240 culture system, identified by API identification system of bioMerieux, and tested by ATB drug sensitivity system for antibiotic sensitivity. Oil red O staining and alizarin red staining were used respectively to detect the pluripotency of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) to adipogenic and osteogenic differentiation. **Results:** A total of 1 562 human umbilical cords were collected. There were 438 strains of bacteria and fungi detected from 386 specimens of umbilical cord preservation fluid, which were positive in microbial culture. There were 193 strains of gram-negative bacteria, mainly e.coli. The sensitivity rate of e.coli to cefoxitin was 90.3%. There were 210 strains of gram-positive bacteria detected, mainly enterococcus, followed by staphylococcus and streptococcus. The sensitivity rates of enterococcus, staphylococcus and streptococcus to penicillin were 93.1%, 19.7% and 92.9%. And there were 35 strains of fungi, mainly candida alba. The sensitivity rate of fungi to amphotericin B were 100.0%. Besides, it made no difference for either cefoxitin, penicillin and amphotericin B applied separately or combinedly to the growth, proliferation and differentiation of HUCMSCs, compared with control group ($P>0.05$). **Conclusion:** The dominant bacteria during collection of umbilical cord are e.coli, enterococcus and candida alba orderly. Cefoxitin, penicillin and amphotericin B can be added into the umbilical cord preservation fluid to reduce contamination.

Key words umbilical cord collection contamination; microbial species distribution; antibiotics; human umbilical cord mesenchymal stem cells

间充质干细胞(MSCs)是成体干细胞的一种,具有自我更新、高度增殖和多向性分化潜能^[1-2]。研究表明 MSCs 在神经系统疾病、血液系统疾病、糖尿病

等疾病的治疗中应用前景广阔^[3-10]。目前,骨髓被认为是 MSCs 的经典来源,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)因具有数量丰富、繁殖力强、安全可靠、免疫原性低、治疗疾病种类多、取材方便等优点被认为是替代骨髓源 MSCs 的理想选择^[11-13]。然而在脐带采集过

基金项目 天津市教委科研计划项目(2016YD01)

作者简介 史丽(1978-),女,副研究员,硕士在读,研究方向:干细胞研究;通信作者:邓为民, E-mail: dengweimin@tmu.edu.cn。

程中,脐带污染的风险较高,因此如何控制脐带污染成为 HUCMSCs 应用中一个亟待解决的问题。本研究对脐带间充质公共库 386 份微生物培养阳性标本进行鉴定和药敏分析,选择敏感性较高的抗生素加入培养基中,观察其对 HUCMSCs 生长、增殖和多向诱导分化的影响,为脐带采集液中抗生素的合理添加提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 菌株来源为 386 份脐带采集液微生物培养阳性标本。天津市中心妇产科医院采集的 1 562 份脐带,放入脐带采集液中保存,送至脐带间充质公共库;HUCMSCs 由脐带间充质公共库提供。

1.2 仪器 BacT/Alert 3D 全自动血培养仪(法国梅里埃公司);ATB 微生物鉴定及药敏分析仪(法国梅里埃公司);CO₂ 培养箱(Thermo);超净工作台(北京冠鹏净化设备有限公司);OLYMPUS 倒置显微镜 X70 (日本 OLYMPUS 公司);MultiskanTM FC 型酶标仪(Thermo);Fj-2008 全自动免疫计数仪(西安 262 厂)。

1.3 试剂与药品 BacT/Alert 系统专用需氧厌氧瓶(法国梅里埃公司);血琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、沙保罗琼脂培养基(天津金正公司);API 系统的细菌鉴定卡与药敏试验卡(法国梅里埃公司);细胞培养基(DMEM:F12=1:1)(GIBCO 公司);青霉素(GIBCO 公司);两性霉素 B(GIBCO 公司);头孢西丁、台盼蓝、地塞米松、吡哆美辛、油红 O、β-磷酸甘油、2-磷酸-L-抗坏血酸和胰岛素(Sigma 公司)。

1.4 方法

1.4.1 微生物鉴定和药敏 脐带采集后放入脐带采集液中保存,然后送至脐带间充质库。注射器抽取 12 mL 脐带采集液,需氧瓶、厌氧瓶各 6 mL 进行微生物培养。凡系统报告为阳性瓶时,应从菜单扩展功能项进入观察曲线状态,并及时转种血琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、沙保罗琼脂培养基,置恒温孵箱 35℃ 培养 18~24 h。按照标准化操作流程,将细菌或真菌制成菌悬液,接种于相应的鉴定卡和药敏卡,35℃ 温箱培养 18~24 h,其中 ATB STAPH 药敏卡需培养 48 h,读取结果。

1.4.2 HUCMSCs 形态、生长和增殖情况 根据细菌及真菌的鉴定和药敏结果选择头孢西丁、青霉素、两性霉素 B。随机选取 10 份标本观察加入的抗生素对细胞生长和增殖是否有影响。将已培养 2~3 d 生长旺盛的 HUCMSCs,用 0.25% 胰酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(D 培养液)将其稀释成 1×10⁴/mL,加入 24 孔培养板,每孔 1 mL,置

于 37℃ 的 5% 二氧化碳培养箱中 24 h 后,吸出培养液。分组处理如表 1。倒置相差显微镜下观察各组细胞培养 4 d 后的形态。再更换培养液第 0、1、3、5、7 天台盼蓝染色作活体计数,10 份标本取均值绘制 HUCMSCs 的生长曲线。

表 1 HUCMSCs 中抗生素分组

Tab 1 Groups of antibiotics in HUCMSCs

分组	D 培养液 (1 mL)	抗生素(终浓度均为 16 mg/L)		
		头孢西丁	青霉素	两性霉素 B
b	+	-	-	-
c	+	+	-	-
d	+	-	+	-
e	+	-	-	+
f	+	+	+	+

注:HUCMSCs:人脐带间充质干细胞

1.4.3 HUCMSCs 体外向脂肪细胞诱导分化 按 1.4.2 分 5 组,取第 3 代 HUCMSCs,按每孔 1×10⁴/mL 细胞浓度接种于 6 孔板中,按表 1 分组加入抗生素。待细胞融合达 80% 时分别更换为加入成脂诱导液(1 μmol/L 地塞米松+100 μmol/L 吡哆美辛+10 mg/L 胰岛素+0.5 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤)的 D 培养液。每 3 d 或 4 d 换液 1 次,连续诱导 3 周,去除含诱导液的 D 培养液,PBS 洗涤液洗涤 2 次,用多聚甲醛固定,油红 O 染色。另设一空白对照孔为 a 组,也按每孔 1×10⁴/mL 细胞浓度接种于 6 孔板中,只加 D 培养液,不加诱导液,油红 O 染色。加入异丙醇作用 10 min,洗脱细胞内的脂滴,转移到 96 孔板,酶标仪 490 nm 处读取 OD 值。

1.4.4 HUCMSCs 向骨细胞诱导分化 按 1.4.2 分 5 组,取第 3 代 HUCMSCs,按每孔 1×10⁴/mL 细胞浓度接种于 6 孔板中,用 D 培养液培养,按表 1 分组加入抗生素。待细胞融合达 80% 时分别更换为加入成骨诱导液(0.1 μmol/L 地塞米松+10 mmol/L β-磷酸甘油 +50 μmol/L 2-磷酸-L-抗坏血酸)的 D 培养液。每 3 d 或 4 d 换液一次,连续诱导 4 周,其他处理同步骤 1.4.3,茜素红染色。另设一空白对照孔为 a 组,也按每孔 1×10⁴/mL 细胞浓度接种于 6 孔板中,只加 D 培养液,不加诱导液,茜素红染色。

收集成骨诱导分化 4 周后的细胞培养基,采用放射免疫法检测各组培养基中骨钙素含量。

1.5 统计学处理 使用 GraphPad prism 5 进行统计学分析并绘图。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多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。

2 结果

2.1 污染菌分布和药敏 微生物培养阳性的 386 份

脐带采集液,共检出细菌及真菌 438 株。其中革兰阴性菌 193 株(44.1%),主要为大肠埃希菌;革兰阳性菌 210 株(48.0%),主要为肠球菌,其次是葡萄球菌和链球菌;真菌 35 株(8.0%),主要为白假丝酵母菌。转种后检出的主要污染菌分布见图 1。其中,4 例转种未生长判定为假阳性。56 例转种发现有两种微生物污染,其中剖腹产 10 份,顺产 46 份。未发现 2 种以上微生物污染的情况。脐带采集液主要检出菌对 3 种抗生素的敏感率见表 2。

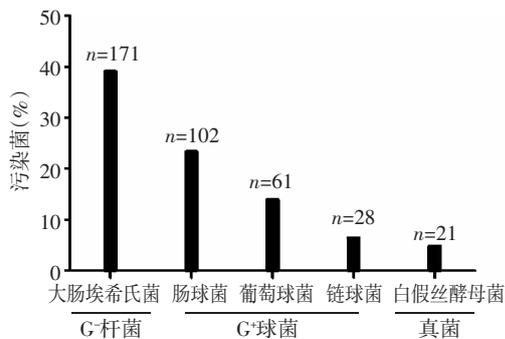


图 1 脐带采集液中主要污染菌的种类和百分比

Fig 1 Species and percentage of predominantly contaminated microorganisms in umbilical cord preservation fluid

表 2 脐带采集液主要检出菌对抗生素的敏感率

Tab 2 Sensitivity rate of main bacteria detected in umbilical cord collection fluid to antibiotics

主要检出菌	抗生素敏感率(%)		
	头孢西丁	青霉素	两性霉素 B
大肠埃希菌	90.3	-	-
肠球菌	-	93.1	-
葡萄球菌	-	19.7	-
链球菌	-	92.9	-
真菌	-	-	100

2.2 HUCMSCs 形态 各组细胞培养 4 d 后的形态显示:试验组 c 组、d 组、e 组和 f 组细胞形态良好,为梭形和多角形,涡旋状排列生长,并可见圆形分裂细胞,表明细胞生长旺盛,细胞折光性强,与对照 b 组相似(图 2)。各组进行细胞计数,绘制细胞的生长曲线(图 3),各组加抗生素分别与不加抗生素对照组比较,差异均无统计学意义($P=0.57$)。结果表明头孢西丁、青霉素、两性霉素 B 和头孢西丁+青霉素+两性霉素 B 对 HUCMSCs 生长和增殖无显著影响。

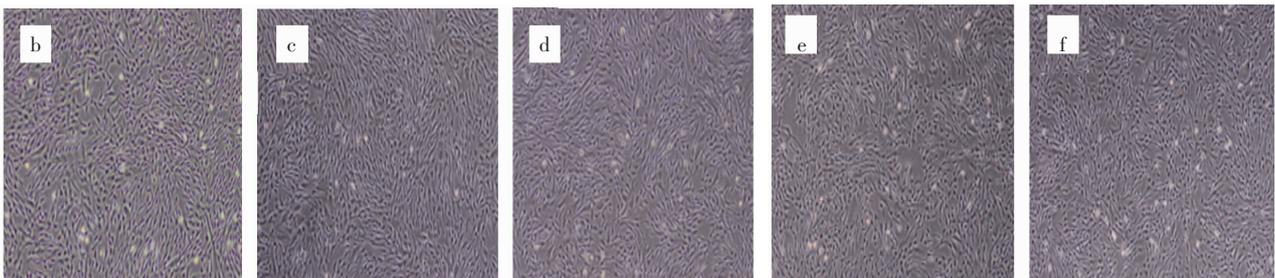
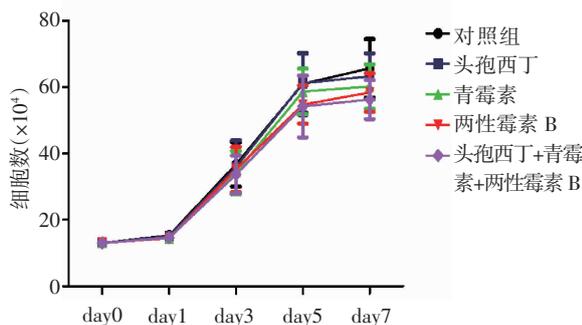


图 2 各组人脐带间充质干细胞培养 4 d 后的形态(40×)

Fig 2 Morphology of HUCMSCs in each group after 4 days of culture (40×)



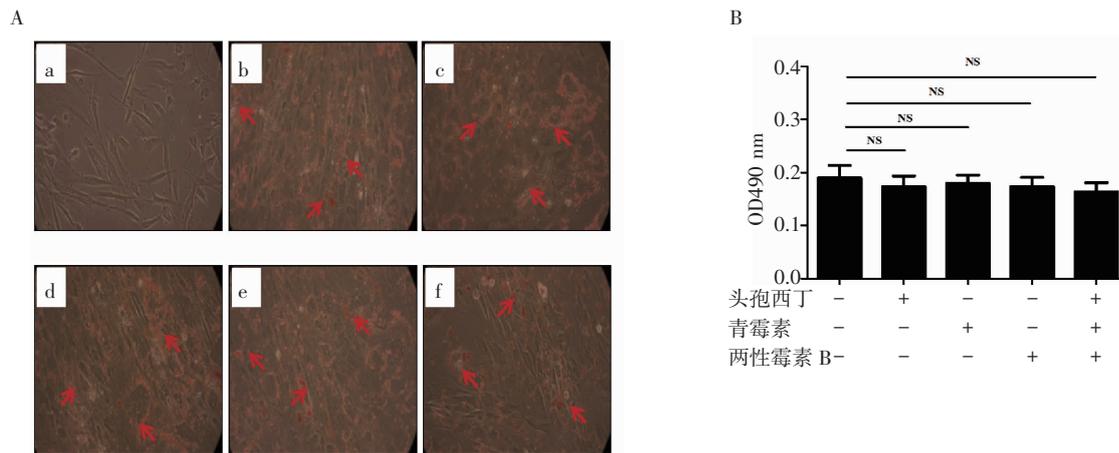
注: HUCMSCs: 人脐带间充质干细胞

图 3 各组人脐带间充质干细胞增殖情况的比较

Fig 3 Comparison of the proliferation of HUCMSCs in each group

2.3 HUCMSCs 向脂肪细胞分化 显微镜下可见细胞胞浆中充满明亮橙红色油滴。试验组 b 组、c 组、d 组、e 组和 f 组与对照组 a 组无明显差别(图 4)。酶标仪定量检测细胞内脂滴,加抗生素各组分别与不加抗生素对照组比较,差异均无统计学意义($P=0.89$)。

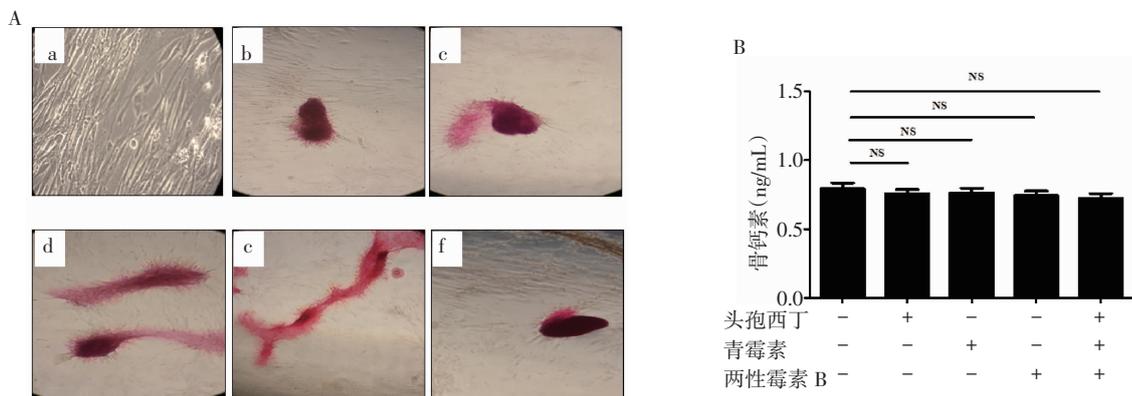
2.4 HUCMSCs 向骨分化 显微镜下可见红色骨结节。试验组 b 组、c 组、d 组、e 组和 f 组与对照组 a 组无明显差别(图 5)。检测各组培养基中骨钙素含量,各组加抗生素分别与不加抗生素对照组比较,差异均无统计学意义($P=0.71$)。



注:A:油红 O 染色,显微镜下观察人脐带间充质干细胞在一定诱导条件下向脂肪细胞分化(200×);B:定量检测细胞内脂滴的统计分析结果,加抗生素各组与不加抗生素对照组比较,均 $P>0.05$;HUCMSCs:人脐带间充质干细胞

图 4 各组人脐带间充质干细胞成脂分化潜能

Fig 4 The adipogenic differentiation ability of HUCMSCs in each group



注:A:茜素红染色,显微镜下观察人脐带间充质干细胞在一定诱导条件下向骨细胞分化(400×);B:定量检测骨钙素含量的统计分析结果,加抗生素各组与不加抗生素对照组比较, $P>0.05$;HUCMSCs:人脐带间充质干细胞

图 5 各组人脐带间充质干细胞成骨分化潜能

Fig 5 The osteogenic differentiation ability of HUCMSCs in each group

3 讨论

本研究通过对 386 份脐带采集标本的研究发现,共检出细菌及真菌 438 株。其中革兰阴性菌 193 株(44.1%),主要为大肠埃希菌;革兰阳性菌 210 株(48.0%),主要为肠球菌,其次是葡萄球菌和链球菌;真菌 35 株(8.0%),主要为白假丝酵母菌。

细胞培养时常出现污染现象,常在培养基中加青霉素和链霉素预防污染^[4]。本研究发现,大肠埃希菌对头孢西丁的敏感率为 90.3%,肠球菌、葡萄球菌、链球菌对青霉素的敏感率分别为 93.1%、19.7%、92.9%,真菌对两性霉素 B 的敏感率为 100%。因此,保存脐带的采集液中加入头孢西丁、青霉素和两性霉素 B,可有效减少脐带污染。

HUCMSCs 的生长曲线和细胞形态均反映头孢西丁、青霉素、两性霉素 B 和三者混合使用(终浓度

均为 16 mg/L)对 HUCMSCs 生长和增殖无影响,也不影响 HUCMSCs 经诱导向脂肪细胞分化和向骨细胞的分化。头孢西丁的药理机制是通过与一个或多个青霉素结合蛋白(PBPs)结合,抑制细菌分裂活跃的细胞的细胞壁生物合成,从而起抗菌作用。青霉素所含的青霉烷能使细菌细胞壁的合成发生障碍,导致细菌溶解死亡。两性霉素 B 为多烯类抗真菌抗生素,通过影响细胞膜通透性发挥抑制真菌生长的作用。人体细胞没有细胞壁,仅有细胞膜,头孢西丁、青霉素均作用于细胞壁,故不损害人体细胞。本研究结果提示 16 mg/L 头孢西丁和青霉素对 HUCMSCs 形态、生长、增殖和诱导分化无影响;16 mg/L 两性霉素 B 既能抑制真菌生长,又对 HUCMSCs 形态、生长、增殖和诱导分化无影响。与黄文敬等^[5]研究认为两性霉素 B 在剂量高于 30 mg/L 时才有细胞毒性结果一致。

综上,本研究证实,保存脐带的采集液中加入头孢西丁、青霉素和两性霉素 B(终浓度均为 16 mg/L),可有效减少脐带采集细菌和真菌污染,很大程度上避免脐带 HUCMSCs 因被污染而废弃。本研究可为脐带采集液中抗生素的合理添加提供实验依据,为 HUCMSCs 的应用提供保障。

参考文献:

- [1] CHRIST B, BRÜCKNER S, WINKLER S. The therapeutic promise of mesenchymal stem cells for liver restoration[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(11):673
- [2] BERARDIS S, DWISTHI SATTWIK A P, NAJIMI M, et al. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: current situation and future prospects[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(3):742
- [3] LI J F, ZHANG D J, GENG T, et al. The potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis[J]. Cell Transplant, 2014, 23:113
- [4] LI X, HU Y D, GUO Y, et al. Safety and efficacy of intracoronary human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell treatment for very old patients with coronary chronic total occlusion[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(11):1426
- [5] FU Y, WANG Q, ZHOU J, et al. Reduced intensity conditioning and co-transplantation of unrelated peripheral stem cells combined with umbilical cord mesenchymal stem/stroma cells for young patients with refractory severe aplastic anemia[J]. Int J Hematol, 2013, 98(6):658
- [6] LEE R H, PULIN A A, SEO M J, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1):54
- [7] JOHNSON K, ZHU S, TREMBLAY M S, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair[J]. Science, 2012, 336(6082):717
- [8] MORA-LEE S, SIREROL-PIQUER M S, GUTIÉRREZ-PÉREZ M, et al. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43683
- [9] 王原飞, 李亚雄, 张雅永, 等. 人脐带间充质干细胞治疗心肌梗死:问题、作用及展望[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(9):1470
- [10] 于双杰, 陈黎明, 吕飒, 等. 人脐带间充质干细胞治疗失代偿性乙型肝炎肝硬化的安全性与疗效[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(1):51
- [11] KARAHUSEYINOGLU S, CINAR O, KILIC E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and *in vitro* surveys[J]. Stem Cells, 2007, 25(2):319
- [12] 王凤昌, 何志旭, 舒丽萍, 等. 脐带间充质干细胞增殖分化实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38:432
- [13] LI T, XIA M, GAO Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(9):1293
- [14] CAPELLI C, PEDRINI O, VALGARDSDOTTIR R, et al. Clinical grade expansion of MSCs[J]. Immunol Lett, 2015, 168(2):222
- [15] 黄文敬, 刘俊江, 周建宇, 等. 两性霉素 B 处理人脐带间充质干细胞的培养与分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4479

(2021-01-27 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织