

文章编号 1006-8147(2019)03-0225-05

论 著

# 无血清培养基对深低温冻存复苏后的间充质干细胞免疫功能的研究

韩 颢<sup>1,2</sup>, 白 虹<sup>1</sup>

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070;2.中源协和生物细胞存储服务(天津)有限公司,天津 300384)

**摘要** 目的:探讨无血清培养基对冻存后的间充质干细胞(HUC-MSCs)免疫调节功能的影响,明确其成脂成骨生物学特性,为临床应用奠定基础。方法:(1)分离脐带中的 HUC-MSCs,传代纯化后深低温冻存。(2)冻融后的 HUC-MSCs 分别以含 10%胎牛血清的培养基(SCM),无血清培养基两种培养条件培养。(3)观察两组细胞生长状态,革兰染色计数,计算细胞活率。(4)流式细胞术检测两组细胞的表面标志物。(5)成脂成骨诱导,茜红素染色和油红染色观察诱导情况。结果:(1)两组细胞均以漩涡状贴壁,无血清培养基培养的细胞体积略小。(2)在细胞总数及活性方面,两组细胞有些微差异,可忽略不计。(3)流式细胞术显示其对 PE-CD34 不表达,对 PE-CD105、PE-CD90、PE-CD73、PE-CD44 和 PE-CD29 高表达。(4)对无血清培养基(SFM)所培养得到的 HUC-MSCs 历经约 21 d 的成骨细胞和脂肪细胞专向分化诱导,发现其具有可媲美 SCM 培养的 HUC-MSCs 的分化能力。结论:无血清培养基同有血清培养基相比,对深低温冻存复苏后的间充质干细胞免疫调节功能无明显差异,可替代有血清培养基进行细胞培养。

**关键词** 脐带间充质干细胞;无血清培养基;细胞冻存;细胞复苏

中图分类号 R392

文献标志码 A

## Study on the immune function of mesenchymal stem cells in serum-free medium after cryopreservation and resuscitation

HAN Hao<sup>1,2</sup>, BAI Hong<sup>1</sup>

(1.Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;2. Zhongyuan Concorde Biological Cell Storage Service (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300384, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of serum-free medium on immune regulation of cryopreserved mesenchymal stem cells (HUC-MSCs), and to clarify the biological characteristics of adipogenic osteogenesis for clinical application. **Methods:** (1) Mesenchymal stem cells(HUC-MSC s) were isolated from the umbilical cord and subcultured for cryopreservation. (2) HUC-MSCs were cultured in two culture conditions: 10% fetal bovine serum medium and serum-free medium. (3) Cell growth was observed, and cell viability was calculated by Gram staining. (4) Flow cytometry was used to detect the surface markers of the two groups of cells. (5) adipogenic osteogenesis induction, alizarin staining and oil red staining were used to observe the induction. **Results:** (1) The cells of both groups adhered to each other in a whirlpool shape, and the cells cultured in serum-free medium were slightly smaller. (2) In terms of the total number and activity of cells, there were slight differences between the two groups. (3) Flow cytometry showed no expression of HLA-DR, PE-CD86, PE-CD80, PE-CD45, PE-CD11b, PE-CD34, PE-CD31, and PE-CD14, but low expression of PE-CD106, high expression of PE-CD105, PE-CD90, PE-CD73, PE-CD54, PE-CD44 and PE-CD29. (4) HUC-MSCs cultured in serum-free medium(SFM) were induced to differentiate into osteoblasts and adipocytes for about 21 days. It was found that the differentiation ability of HUC-MSCs cultured in SFM was close to that of HUC-MSCs cultured in SCM. **Conclusion:** Compared with the conventional medium, the serum-free medium shows no significant difference in the immune regulation function of mesenchymal stem cells after cryopreservation and resuscitation, that being said, the serum-free medium may be used as a substitution product used in MSCs culture.

**Key words** umbilical cord mesenchymal stem cells; serum free medium; cell cryopreservation; cell resuscitation

脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cell, HUC-MSCs)是一种存在于机体血管周围组织和脐带华通氏胶组织中的干细胞<sup>[1]</sup>。来源于人脐带的 MSCs,其不仅在细胞数量还是扩增能力方面均不弱于骨髓来源 MSCs<sup>[2]</sup>,并且比骨髓来源的 MSCs 更容易获得,不存在伦理方面的争议,因

此近年来成为了热门研究课题<sup>[3]</sup>。一般的体外 HUC-MSCs 培养方法,都会在培养基里加入一定浓度的胎牛血清<sup>[4]</sup>,主要是为了给间充质干细胞的生长增殖提供养分如激素、生长因子、转运蛋白等<sup>[5]</sup>,但这种方法存在多种缺点:如血清批次间的差异波动,成分不明确,来源不稳定等各种原因,使用前需要进行大量的验证工作,因此会促使生产和科研工作变得复杂<sup>[6]</sup>。无血清培养基(serum free medium, SFM)作为合成培

作者简介 韩颢(1984-),女,助理工程师,硕士在读,研究方向:脐带间充质干细胞;通信作者:白虹, E-mail: Hongbai25@163.com。

培养基的一种,其成分主要包括血清补充因子和基础培养基基本成分<sup>[7]</sup>。因为其含有的成分都是已知的,因此血清原因造成的污染和对细胞的毒性作用这些均可避免<sup>[8]</sup>。这大大降低了细胞培养的失败率,提高了实验结果的可靠性。一些报道曾指出,SFM 培养的 HUC-MSCs 可在短时间内大量增殖<sup>[9]</sup>,细胞体积较小,经诱导分化成脂成骨的能力不亚于含血清培养基培养(serum containing medium, SCM)的 HUC-MSC<sup>[10]</sup>。本研究对深低温冻融后的 HUC-MSCs 进行鉴定<sup>[11]</sup>,分析无血清培养对人脐带间充质干细胞体外增殖情况及免疫调节的影响,评价 HUC-MSCs 在 SFM 培养后的免疫水平<sup>[12]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 生物安全柜(As2-4s1,esco)、倒置光学显微镜(primo vert,蔡司)、台式冷冻高速离心机(15R,贝克曼库尔特)、二氧化碳培养箱(cc1-170-b,esco)、电动移液枪(accur-jet,普兰德)、流式细胞仪(deflex,贝克曼库尔特)、电热恒温水浴锅(SAP12,英国固尔特)。

1.1.2 主要试剂 X-VIVO 15 培养基(LONZA)、MSC 成骨分化培养液(GIBICO)、TRYPLE TM SELECT (GIBICO)、MSC 成脂分化培养液 (GIBICO)、L-DMEM (BI)、谷氨酰胺 (BI)、DMEM/F12 培养基 (BI)、CryoSure-DEX40(WAK)。

1.1.3 脐带取自满 40 周剖宫产新生儿。

### 1.2 试验方法

1.2.1 人脐带间充质干细胞的分离和培养 使用贴片培养法,将得到的新鲜脐带在切除脐动脉和脐静脉后切割成约 1 mm<sup>3</sup> 的碎片并均匀地铺在 75T 培养瓶中。整个体系每 5 d 全量换液 1 次,一直到细胞到达 80%融合度时进行传代处理。

1.2.2 HUC-MSCs 的冻融 细胞传代至第三代时,此时的融合度一般在 80%的范围波动,丢弃培养液,同时加入一定量的TRYPLE 消化细胞,选用生理盐水进行洗涤处理,加一定量的冻存液促使其浓度保持在 1×10<sup>6</sup>/mL,之后在冻存管中进行封装,移至降温盒,最后转移到-80℃冰箱中保存 24 h,完成后继续将其转入-196℃液氮罐中进行为期 4 周时间的保存。将细胞置于 37℃水浴条件下进行复苏,溶化之后依次向里面加入有和没有血清的 75T 培养瓶进行培养。

1.2.3 细胞总数、活率的计算 细胞消化后用生理盐水将其悬至 100 mL,用移液枪吸取 2 mL 细胞悬液,稀释 10 倍后取 0.2 mL 细胞悬液计数,计算过程如下:

活细胞:死细胞:	活细胞:死细胞:
活细胞:死细胞:	活细胞:死细胞:

细胞悬液浓度=(4 大格活细胞数/4)×2×10<sup>4</sup>

细胞总数=(4 大格活细胞数之和/4)×2×10<sup>4</sup>×体积

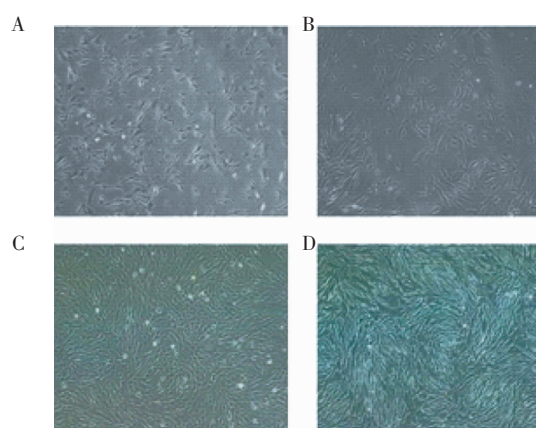
细胞活率%= $\frac{4 \text{ 大格活细胞数之和}}{4 \text{ 大格活细胞数之和} + 4 \text{ 大格死细胞数之和}} \times 100\%$

1.2.4 HUC-MSCs 免疫表型的检测 当目的细胞培养至第三代后,经 TRYPLE 行消化处理,此时可制得单细胞悬液。之后向里面加入一定量的 CD-105、CD-90、CD-73、CD-44、CD-29 和 CD-34;对其进行混匀处理。完成后,在室温条件下于黑暗处进行 20 min 的孵育处理。经 PBS 清洗一次后继续向里面加入约 500 μL 的 PBS 并将其移至离心管中。使用 FACS Calibur 流式细胞术进行细胞免疫表型的检测。

1.2.5 无血清培养基培养的 HUC-MSCs 的分化能力检测 使用 SFM 组的 HUC-MSCs 和 SCM 组的 HUC-MSCs,利用诱导脂肪形成和成骨分化的特殊培养基将这两组 HUC-MSCs 朝着脂肪细胞和成骨细胞定向分化 3 周。用 S-red S 染色溶液和油红 O 染色溶液染色后,通过显微镜鉴定细胞。

## 2 结果

2.1 SFM 培养的 HUC-MSCs 的形态观察 图 1 所示,HUC-MSCs 在接种后第 2 天,这时两组细胞绝大部分都发生贴壁,只有少量出现悬浮。进一步观察发现贴壁细胞拥有刺状的短芽伸出,到第 4 天的时候,这时其 SCM 组细胞已经将瓶底铺满,这时细胞融合度高达 90%,到第 5 天的时候,经观察发现 SFM 也将瓶底铺满,SCM 组细胞则呈旋涡状排列。SFM 组细胞均匀平铺。



A. SCM 组接种后第 2 天;B. SFM 组接种后第 2 天;C. SFM 组接种后第 5 天;D. SCM 组接种后第 4 天

图 1 无血清培养基培养的 HUC-MSCs 的细胞形态

Fig 1 Cell morphology of HUC-MSCs cultured in serum-free medium

## 2.2 细胞总数、活率的计算 两组细胞悬液体积定为 100 mL。

SFM 组:

活细胞: 24 死细胞: 1	活细胞: 26 死细胞: 2
活细胞: 25 死细胞: 2	活细胞: 27 死细胞: 1

细胞悬液浓度=(4 大格活细胞数/4) $\times 2 \times 10^4 = 5.1 \times 10^5$

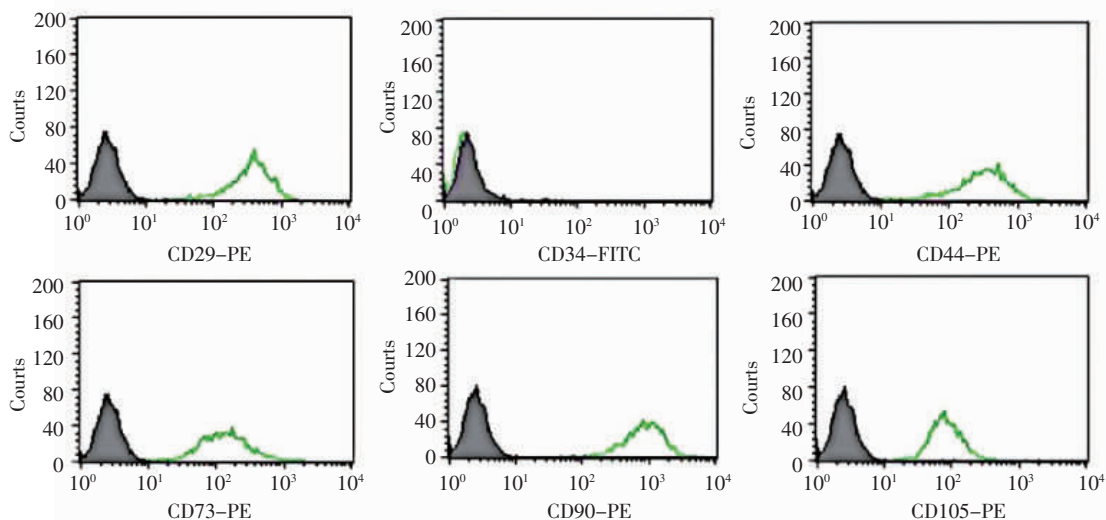
细胞总数=(4 大格活细胞数之和/4) $\times 2 \times 10^4 \times$  体积=  $5.1 \times 10^6$

细胞活率%=4 大格活细胞数之和/(4 大格活细胞数之和+4 大格死细胞数之和) $\times 100\% = 96.2\%$

SCM 组:

活细胞: 22 死细胞: 2	活细胞: 26 死细胞: 0
活细胞: 24 死细胞: 1	活细胞: 27 死细胞: 1

SCM组



SFM组

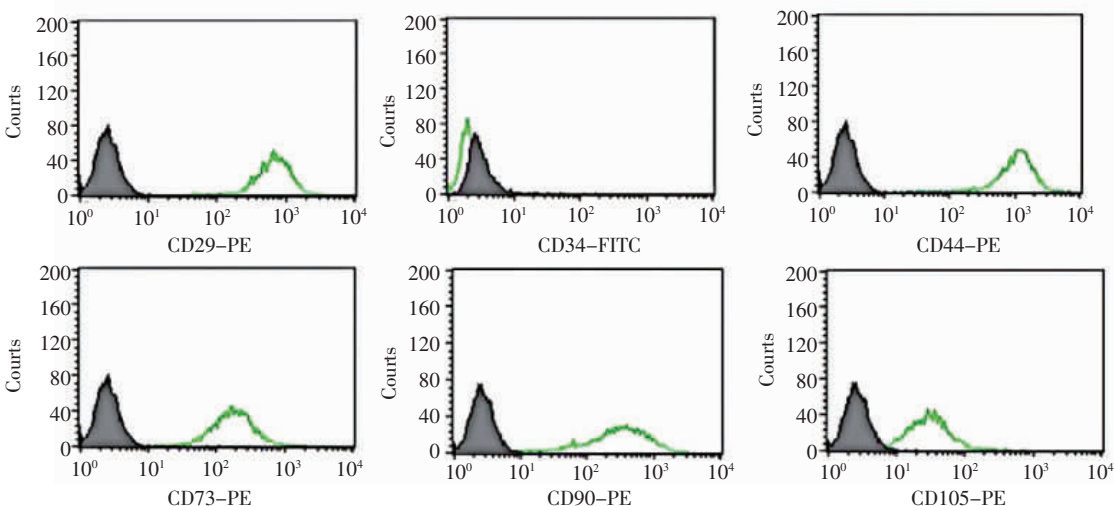


图2 无血清培养基培养的 HUC-MSCs 的免疫表型

Fig 2 Immunophenotype of HUC-MSCs cultured in serum-free medium

细胞悬液浓度=(4 大格活细胞数/4) $\times 2 \times 10^4 = 4.95 \times 10^5$

细胞总数=(4 大格活细胞数之和/4) $\times 2 \times 10^4 \times$  体积=  $4.95 \times 10^6$

细胞活率%=4 大格活细胞数之和/(4 大格活细胞数之和+4 大格死细胞数之和) $\times 100\% = 95.2\%$

2.3 SFM 培养 HUC-MSCs 的免疫表型 采用流式细胞术分别对 SFM 和 SCM 培养的第 3 代 HUC-MSCs 的免疫表型进行检测。如图 2、表 1 所示,在 SFM 中目的细胞依旧呈现较高的 PE-CD105、PE-CD90、PE-CD73、PE-CD44 和 PE-CD-29 表达。结果还显示两者所培养的三代目的细胞表型检测结果并不具备统计学意义。

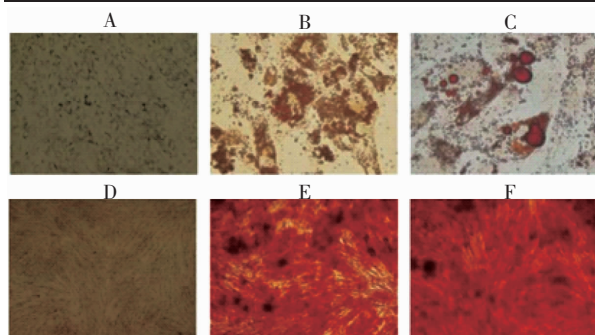
2.4 SFM 培养的 HUC-MSCs 成脂成骨能力 研究发现,当选用 SFM 进行 HUC-MSCs 的培养并将其向着骨细胞和脂肪细胞诱导时,该细胞所具备的分化能力与在 SCM 上培养得到的目标细胞并无明显差别。且研究还发现前者培养的目的细胞在进行脂



肪细胞诱导时会出现脂滴。但是其在成骨细胞诱导时,两者的分化能力并无显著性差异(图 3)。

表 1 无血清和含血清培养基培养 HUC-MSCs 的免疫表型情况  
Tab 1 Immunophenotype of HUC-MSCs cultured in serum-free and serum-containing media

表面标记	SCM /%	SFM/%
CD29	99.31±1.02	98.00±2.30
CD34	0.18±0.04	0.19±0.08
CD44	98.38±1.54	97.15±1.89
CD73	98.58±1.3	98.71±1.02
CD90	98.73±1.15	98.50±1.58
CD105	99.03±1.37	97.53±2.3



A. 成脂诱导阴性对照(40 倍);B. SCM 组的成脂分化(200 倍);  
C. SFM 组的成脂分化(200 倍);D. 成骨诱导阴性对照(40 倍);  
E. SCM 组的成骨分化(40 倍);F.SFM 组的成骨分化(40 倍)

图 3 SFM 与 SCM 培养的 HUC-MSCs 分化鉴定

Fig 3 Differentiation and identification of hUC-MSCs cultured with SFM and SCM

### 3 讨论

越来越多的报道指出在 SFM 条件下培养出的 HUC-MSCs 仍能保持该有的细胞状态、免疫表型及分化潜能<sup>[13]</sup>。但在对其临床应用等方面的表现还需要更多的分析评估,已有的研究表明诸多因素都会对 HUC-MSCs 的疗效产生影响,如培养时间长短、细胞制备流程、输注方式方法等<sup>[14]</sup>。HUC-MSCs 的冻存与复苏可以保证 HUC-MSCs 在临床应用的安全性、时效性及存储的规模性,有效弥补了 HUC-MSCs 不能在体外持续扩增培养的劣势,对深低温冷冻复苏后的 HUC-MSCs 使用无血清培养基进行扩增培养具有很重要的现实意义<sup>[15]</sup>。本研究也证实了经过冷冻复苏后的 HUC-MSCs 在无血清培养基条件下培养时能大量的增殖,细胞呈典型的间充质干细胞形态,与含血清培养的 HUC-MSCs 相比,细胞形态略有差异<sup>[16]</sup>。HUC-MSCs 接种在无血清培养基中前几天的长势趋于缓慢<sup>[17]</sup>,但其进入到对数期以后,细胞的增殖速度相较于含有 10% 的胎牛血清而言, HUC-MSCs 基本持平,而且在该条件下进行扩增的细胞活性率促使其能够在其他科学研究和临床治

疗中得到广泛运用<sup>[18]</sup>。本研究选用不含血清的培养基将 HUC-MSCs 培养至第三代,然后选用流式细胞术检测其免疫表型,结果显示,当培养基中不含血清时,目的细胞依旧会高度表达 PE-CD105、PE-CD90、PE-CD73、PE-CD44 和 PE-CD29,且对比含有 10% 小牛血清培养基发现就目的细胞表面标记表达水平而言无统计学意义。另外,在研究中还对不含血清培养基的目的细胞作成骨、成脂细胞诱导。结果显示两者都具备相当的分化能力。且在向成骨细胞分化的能力方面无明显差异,但是其在脂肪细胞分化方面两者有着不同的表现。一般是 SFM 培养的优于 SCM 培养的 HUC-MSCs 的脂肪滴形成,具体成因还需要进一步的研究探讨。但细胞的这些特点是满足 ISCT 对间充质干细胞的诊断标准的。

综上所述,冷冻后解冻的 HUC-MSCs 在 SFM 培养条件下可以维持 MSCs 的原始细胞形态和免疫表型、分化能力,与用 10% 胎牛血清培养的 HUC-MSC 无统计学差异。

### 参考文献:

- [1] Macfarlane R J, Graham S M, Davies P S, et al. Anti-inflammatory role and immunomodulation of mesenchymal stem cells in systemic joint diseases: potential for treatment[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(3): 243
- [2] Molendijk I, Duijvestein M, van der Meulen-de Jonq A E, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease[J]. J Allergy, 2012, 15(4): 187408
- [3] Azouna N B. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum[J]. Stem Cell Res Ther, 2012, 3(1): 6
- [4] Chase L G, Lakshminpathy U, Solchaga L A, et al. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2010, 1(1): 8
- [5] Crapnell K, Blaesius R, Hastings A, et al. Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(10): 1409
- [6] 杨婷,陈广华,薛胜利,等.无血清和含胎牛血清培养基培养的脐带间充质干细胞生物学特性比较研究[J].中华血液学杂志,2012, 33(9): 715
- [7] Wang D, Chen K, Du W T, et al. CD14+ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(15): 2414
- [8] Liu W H, Liu J J, Wu J, et al. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55487
- [9] Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2[J]. J Immunol, 2012, 188(1): 21

(下转第 263 页)

性率均低于癌组织,研究还发现 XIAP 的表达与前列腺癌的转移相关,XIAP 表达高的前列腺癌更易发生转移。而通过小分子干扰技术下调 XIAP 蛋白的表达后,前列腺癌细胞凋亡增加。本研究结果显示 XIAP 蛋白在前列腺癌中有较高的表达,而在前列腺增生组织中极微量表达,说明 XIAP 在前列腺癌组织中选择性表达,而几乎不表达于前列腺增生组织。其表达与前列腺癌组织学分级有明显的相关性,提示其在正常黏膜发展到前列腺腺癌的演变过程中可能起着重要的作用。病理分化程度越低的前列腺癌细胞 XIAP 阳性表达越强,而在前列腺增生中几无表达,说明 XIAP 蛋白的表达与细胞的增殖呈正相关,也验证了 XIAP 过度表达的肿瘤预后不良。这符合 Berezovskaya 等<sup>[9]</sup>的观点。随着临床分期的增加、淋巴结转移或远处转移,XIAP 蛋白的表达亦逐渐增加,XIAP 蛋白表达差异在统计学上有显著性意义,说明 XIAP 的表达与前列腺癌的分化及恶性程度有关。XIAP 的高表达可能使前列腺癌细胞避开凋亡、逃离生长监控而异常增殖。检测 XIAP 在前列腺癌组织中的表达,对前列腺癌的恶性程度和预后的判断具有一定参考价值。

本研究还显示 MTA1 和 XIAP 蛋白在前列腺癌组织中的表达呈正相关,这可能与前列腺癌组织中 MTA1 表达的升高减弱了机体对 XIAP 蛋白的抑制作用,使 XIAP 蛋白出现高表达,从而促进了肿瘤细胞的浸润和转移。通过实验可以得到 MTA1 和 XIAP 可作为检测前列腺癌的重要生物学标志,也可对肿瘤恶性程度进行评估。联合检测这两个指标可以对 PCa 的发生、发展、预后判断及药物治疗提

供参考依据。

#### 参考文献:

- [1] Zhong W D, Liu L S, Liu W H, et al. A clinical study on prostate-cancer diagnosis with cDNA microarray[J]. Chinese J Cancer Res, 2015, 17(1):66
- [2] Nawa A, Nishimori K, Lin P, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides[J]. J Cell Biochem, 2010, 79(2): 202
- [3] Mazumdar A, Wang R A, Mishra S K, et al. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor[J]. Nat Cell Biol, 2012, 3(1):30
- [4] Kai L, Wang J, Ivanovic M, et al. Targeting prostate cancer angiogenesis through metastasis-associated protein 1 (MTA1) [J]. Prostate, 2011,71(3): 268
- [5] Hofer M D, Kuefer R, Varambally S, et al. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression [J]. Cancer Res, 2016, 64(3): 825
- [6] Sankaran D, Pakala S B, Nair V S, et al. Mechanism of MTA1 protein overexpression-linked invasion: MTA1 regulation of hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR) expression and function[J]. J Biol Chem, 2012, 287(8): 5483
- [7] Morales-Cano D, Calvio E, Rubio V, et al. Apoptosis induced by paclitaxel via Bcl-2, Bax and caspases 3 and 9 activation in NB4 human leukaemia cells is not modulated by ERK inhibition[J]. Exp-Toxicol Pathol, 2013, 1(1): S0940
- [8] Mohd A B, Huang I. MLH1 expression sensitizes ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition[J]. Br J Cancer, 2009, 101(2):269
- [9] Berezovskaya O, Schimmer A D, Glinskii A B, et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cell[J]. Cancer Res, 2016, 65(6): 2378

(2018-08-27 收稿)

(上接第 228 页)

- [10] Bai L, Lennon D P, Caplan A I, et al. Hepatocyte growth factor mediates MSCs stimulated functional recovery in animal models of MS[J]. Nat Neurosci, 2012, 15(6): 862
- [11] Schubert S, Brehm W, Hillmann A, et al. Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture[J]. Cytometry A, 2017, 56(3):93
- [12] Iman A, Nima P Z, Mohsen K M, et al. Adipose Tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells can be isolated using serum-free media[J]. Iran Red Crescent Med J, 2013, 15(4):324
- [13] Genser-Nir M, Daniliuc S, Tevovsky M, et al. Toward a serum-free, xeno-free culture system for optimal growth and expansion of hMSC suited to therapeutic applications[J]. Bmc Proc, 2013, 7(S6):P6
- [14] 李洁,傅勇辉,吴琼,等. 冻存前后脐带间充质干细胞生物学特性的比较[J]. 实验与检验医学, 2014,42(1): 8

- [15] 付旭锋,刘平,陈冰冰,等. 间充质干细胞冻存方法的研究进展[J]. 云南大学学报:自然科学版, 2016, 38(4): 652
- [16] Galipeau J. Concerns arising from MSC retrieval from cryostorage and effect on immune suppressive function and pharmaceutical usage in clinical trials[J]. Isbt Science, 2013, 8(1): 100
- [17] B rcia R N, Santos J M, Teixeira M, et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing[J]. Cytotherapy, 2017, 19(3): 360
- [18] Sidne y L E, Hopkinson A. Corneal keratocyte transition to mesenchymal stem cell phenotype and reversal using serum-free medium supplemented with fibroblast growth factor-2, transforming growth factor- 2 and retinoic acid[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 8(2):120

(2018-08-14 收稿)