

· 基础研究 ·

# 低温冻存对人绒毛膜来源的间充质干细胞多向分化潜能的影响

陈霞<sup>1</sup>, 尹晓娟<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军第三二四医院儿科, 重庆 400020; 2. 中国人民解放军北京军区总医院附属八一儿童医院新生儿科, 北京 100700)

**摘要:**目的 探讨低温保存对人绒毛膜来源的间充质干细胞(hCDMSC)体外生长特性和多向分化潜能的影响,验证冻存后hCDMSC作为组织工程种子细胞的可行性。方法 用胶原酶和胰蛋白酶法消化胎盘组织基蜕膜,传代培养,取第4代细胞置于液氮深低温(-196℃)条件下冻存3个月后复苏,采用MTT法测定复苏hCDMSC的增殖活性,茜素红和油红O染色检测其成骨、成脂诱导分化情况。未经低温保存的hCDMSC作为对照。结果 低温保存复苏后的hCDMSC增殖活性、多向诱导分化能力与未冻存细胞比较,差异无统计学意义,细胞的茜素红和油红O染色呈阳性反应。结论 低温保存对hCDMSC体外生长能力和多向诱导分化能力没有影响,冻存后hCDMSC可以作为组织工程的种子细胞。

**关键词:**间质干细胞;绒毛膜绒毛取样;低温保存;细胞分化;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.028

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)17-1733-03

## Influence of cryopreservation on multilineage differentiation potential of human chorion-derived mesenchymal stem cells

Chen Xia<sup>1</sup>, Yin Xiaojuan<sup>2</sup>

(1. Department of Pediatrics, the 324th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400020, China;

2. Department of Division of Neonatology, Bayi Children's Hospital Affiliated to the Military General Hospital of Beijing Chinese People's Liberation Army, Beijing 100700, China)

**Abstract: Objective** To explore the influence of cryopreservation on growth characteristics and multilineage differentiation potential of human chorion-derived mesenchymal stem cells (hCDMSC) *in vitro* and verify the feasibility of cryopreserved hCDMSC serving as seed cells for tissue engineering. **Methods** Collagenase and trypsin were used to trypsinize placental basal decidua, cells were subcultured and the fourth generation cells were resuscitated after 3 months cryopreservation in liquid nitrogen under the conditions of deep hypothermia (-196 °C). MTT method was employed to measure the cellular proliferation of resuscitated hCDMSC and alizarin red and oil red O staining were applied to detect the osteogenic and adipogenic differentiation. hCDMSC without cryopreservation served as a control. **Results** There were no significant difference in proliferation activity and multilineage differentiation potential of resuscitated hCDMSC after cryopreservation compared to those without cryopreservation, hCDMSCs demonstrated positive staining with alizarin red and oil red O. **Conclusion** Cryopreservation has no influence on proliferation and multilineage differentiation potential of hCDMSC *in vitro*, and cryopreserved hCDMSCs can serve as seeds for tissue engineering.

**Key words:** mesenchymal stem cells; chorionic villi sampling; cryopreservation; cell differentiation; cell proliferation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是最早来源于人骨髓组织的一类具有多向分化潜能的干细胞,随后在人脂肪组织、外周血、肌肉和结缔组织中也发现了MSC。目前MSC是临床研究最普遍的细胞来源,在组织工程及肿瘤治疗等方面应用广泛。它具有自我更新和多向分化潜能,能在特定诱导条件下分化为多种类型的组织细胞。但成体干细胞在骨髓、外周血及脂肪组织中的含量极低,随着人的年龄增长,其含量逐渐降低,且细胞增殖分化能力也大大下降<sup>[1]</sup>。因此国内外学者探索从更幼稚的组织中(如胎盘、胚胎中)分离MSC<sup>[2-3]</sup>。胎盘是妊娠期存在的特殊器官,对胚胎起屏障、营养、呼吸、排泄和免疫等作用,同时还有一定的内分泌功能,是维持妊娠和胎儿生长发育的重要器官<sup>[4]</sup>。胎盘中的绒毛膜由滋养层和衬于其内面的胚外中胚层组成,从人绒毛膜的基蜕膜中可以分离出MSC,但是MSC在体外长期培养易发生自发分化,而失去多向分化的潜能。因此,为保证整个实验的顺利进行和实验中供体的一致性,随时提供大量的种子细胞,必须对培养的细胞及时冻存,需要时进行复苏。目前很少有低温冻存对人绒毛膜来源的MSC(human chorion-derived MSC, hCDMSC)的特性以及分化诱导能力影响的报道,故本文就此进行研究,为下一步实验做准备。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人足月健康胎盘在符合国家相关法律要求下,经产妇及家属知情同意后获得;HUXMF完全培养基(广州Cyagen公司 HUXMF-90011)、HUXMF成脂诱导完全培养基[广州Cyagen公司 HUXMF-90031成脂诱导剂A:基础培养基175 mL,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)20 mL,青、链霉素各2 mL,谷氨酰胺2 mL,胰岛素200 μL,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)200 μL,吡啶美辛200 μL,地塞米松200 μL;成脂维持剂B:基础培养基175 mL, FBS 20 mL,青、链霉素各2 mL,谷氨酰胺2 mL,胰岛素200 μL]、HUXMF成骨诱导完全培养基(美国Cyagen公司 HUXMF-90021,配方为:基础培养基175 mL, FBS 20 mL, β-甘油磷酸酯2 mL,青、链霉素各2 mL,谷氨酰胺2 mL,地塞米松20 μL,抗坏血酸盐400 μL)、培养皿、六孔板及冻存管(美国BD公司)、胰蛋白酶、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 美国Sigma公司)、FBS(美国Gibco公司)、胶原酶IV(美国sigma公司)。

**1.2 细胞的分离和表面分子鉴定** 按照参考文献[3]的方法,取胎盘靠近母面的基蜕膜面组织,剪碎,经IV型胶原酶和胰蛋白酶消化后,人淋巴细胞分离液离心吸取中间白膜层,接种于含5 mL HUXMF培养液中的六孔板,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱

和湿度培养箱培养,每 3~4 d 换液,待 90% 细胞铺满培养瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,每 3~5 d 传代 1 次。取长满 90% 的细胞,去掉培养液后,加入 2.5 g/L 胰酶消化,形成的细胞悬液  $800 \times g$  离心 5 min,去上清液,加入 HUXMF 完全培养基 2 mL 重悬细胞,调整细胞密度为  $4 \times 10^5$  个/mL。加入白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)34、CD45、CD73 及 CD105 一抗,室温避光反应 1 h,上流式细胞仪检测。

**1.3 hCDMSC 的冷冻保存与复苏** 按照“慢冻速融”的方法<sup>[5]</sup>将体外扩增至第 4 代的 hCDMSC 用 0.25% 胰蛋白酶及 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)消化,加入含 10% DMSO、20% FBS 及 70% HUXMF 的冻存保护剂,细胞终浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。细胞用二步法冻存,细胞冻存管置  $-70^\circ\text{C}$  冰箱 12 h,然后直接移入  $-196^\circ\text{C}$  液氮罐内保存。在  $-196^\circ\text{C}$  液氮深低温条件下冻存 3 个月,取出细胞于  $37^\circ\text{C}$  的恒温水浴箱快速复苏,用 HUXMF 完全培养基悬浮细胞,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱培养。以后每 3~5 d 换液一次,传代后行下一步实验。

**1.4 细胞增殖和细胞活力的检测** 未冻存和冻存复苏传至第 4 代的 hCDMSC 以  $1 \times 10^4$  cells/mL 密度接种于 96 孔板中,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱培养。每组 20 孔细胞,分别在第 2、4、6、8 天各取 5 孔细胞,加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5)-dimethylthiazazo(-z-y)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT]  $100 \mu\text{L}$  在  $37^\circ\text{C}$  培养 4 h 后,吸出液体,加入 DMSO 溶解,在 490 nm 读值并绘制生长曲线。未冻存和冻存复苏传至第 4 代的细胞活力分别在第 2、4、6、8 天采用台盼蓝拒染法进行活细胞计数:取  $0.5 \mu\text{L}$  细胞悬液置于 EP 管,再加入  $0.1 \text{ mL}$  0.5% 台盼蓝染液,混合 2 min 后制片镜检,采用血细胞计数板计数。

**1.5 hCDMSC 成骨和成脂诱导** 将复苏后传至第 4 代的细胞接种于六孔板,分别行成骨和成脂诱导。成骨诱导顺序如下:每孔加入 2 mL HUXMF 培养基,24 h 后换为成骨诱导剂,每 3 d 换 1 次液,共需 3 周左右,茜素红染色。成脂诱导顺序如下:细胞长满 80% 后,换为成脂诱导培养基 A,3 d 后加入成脂诱导剂 B,24 h 后加入成脂诱导培养基 A,反复 3 次后用成脂诱导剂 B 再培养 7 d,每 3 d 换 1 次液,油红 O 染色。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人 hCDMSC 形态及其表面分子的鉴定** 初接种的细胞种类较多,大部分呈圆形。接种 24 h 后可见部分圆形单核细胞贴壁。原代培养 36~48 h 后贴壁的单核细胞开始增多,但仍保留圆形。72 h 后细胞开始迅速增殖并出现多种形态。反复换液和传代培养去除非贴壁细胞,至第 4 代的骨髓间质干细胞(perioseal mesenchymal stem cell, PMSC)形态基本一致,为梭形或扁平形,增殖至细胞融合时,倒置相差显微镜下观察呈漩涡状排列(见封 3 图 1 左图)。复苏后细胞仍呈克隆性生长,可见长梭形、多角形结构,以长梭形结构为主,核仁明显(见封 3 图 1 右图)。表面分子鉴定结果为 CD34(-)、CD45(-)、CD73(+ )及 CD105(+),证实分离的细胞不表达造血干细胞标志物,具有 MSC 的表型特征。

**2.2 复苏细胞的增殖能力检测** 复苏 3 d 后 hCDMSC 台盼蓝染色结果见表 1。低温冻存组和未冻存组细胞在接种后 2 d 为细胞的贴壁生长阶段,第 4~8 天为对数生长期,增殖活跃

(图 2)。

表 1 未冻存和冻存复苏细胞台盼蓝拒染率比较

组别	培养第 2 天	培养第 4 天	培养第 6 天	培养第 8 天
未冻存细胞	95.21±4.45	94.11±5.36	93.90±4.32	92.78±5.72
冻存细胞	95.10±6.22*	93.89±4.22*	93.60±5.20*	92.50±3.89*

\*:  $P > 0.05$ , 与未冻存细胞组比较。

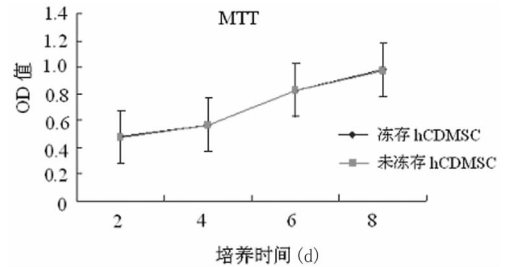


图 2 冻存和未冻存第 3 代 hCDMSC 的生长曲线 (MTT)

**2.3 成骨诱导 hCDMSC 的形态观察** hCDMSC 成骨诱导 3 d 后,细胞呈多中心,放射状排列,位于中心的细胞体积增大。诱导 7 d 后,细胞形态变为卵圆形或多角形,细胞形态均一,体积明显增大。诱导 14 d,细胞体积增大更为明显,有多角形结构,扁平突起变短,细胞质内颗粒状物质增加(见封 3 图 3 左图)。茜素红染色后可见细胞变成橙红色,可见染成红色的钙结节(见封 3 图 4 左图)。

**2.4 成脂诱导 hCDMSC 的形态观察** hCDMSC 成脂诱导 3 d 后,倒置显微镜观察细胞由梭形变成圆形或多角形,体积增大,小部分细胞质内开始出现很小的折光性很强的脂滴,位于核周。诱导 7 d 后,部分细胞脂滴增加,诱导 14 d 后脂滴进一步增多,细胞呈圆形或椭圆形,体积增大(见封 3 图 3 右图)。油红 O 染色鉴定脂肪细胞中含有大小不等脂肪滴,脂滴被染成橙红色(见封 3 图 4 右图)。

## 3 讨论

胎盘主要由起源于细胞滋养层和胚外中胚层的胎儿丛绒毛膜和母体子宫基蜕膜共同组成。在胚胎发育早期,整个绒毛膜表面的绒毛分布均匀,随着胚胎的发育,在血供的影响下,形成表面无绒毛的平滑绒毛膜和表面绒毛分支,生长茂密的丛密绒毛膜。从胎盘绒毛膜分离的 MSC 表达 CD105、CD90、CD73、CD44、CD29、人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)-ABC、CD13、CD10、CD49c、CD49d、CD49e、CD54 及 CD166,还表达转录因子 Oct-4,但不表达 CD14、CD34、CD45、CD31、HLA-DR、CD133 及 CD3<sup>[6-7]</sup>,并可分化为心肌样细胞、胰岛样细胞、神经样细胞和内皮样细胞<sup>[8-9]</sup>。胎盘来源的 MSC 有较骨髓来源的 MSC 更强的增殖活性和更长的生存期<sup>[10]</sup>,取材方便、来源广,易分离培养<sup>[11]</sup>。而且胎盘来源的 MSC 在体外对不同胎盘部位的造血干细胞的体外扩增的支持作用强于脐血和骨髓<sup>[12-14]</sup>,因此,它具有良好的临床应用前景。

研究表明 hCDMSC 在体外扩增速度快,而且多次传代后仍然保持染色体的稳定性,免疫表型指标如 CD9、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD117、HLA-ABC、HLA-DR、HLA-DP 以及 HLA-DQ 不发生改变,而且传代后纯度更高<sup>[15]</sup>。因此有必要对 hCDMSC 冻存以建立种子细胞库。本研究对 hCDMSC 进行深低温冻存,在复苏传代后发现低温冻存对 hCDMSC 增殖活性没有影响。复苏传代的 hCDMSC 用成骨、成脂诱导剂诱导 3 d 均可见细胞形态的改变,诱导 3 周后茜素红染色下可见橙红色细胞以及深红色的钙结节,油红 O

染色发现细胞中含有大小不等脂肪滴,脂滴被染成橙红色,进一步证实了低温冻存不会影响 hCDMSC 的多向分化诱导能力。

hCDMSC 的冻存和复苏在一定程度上弥补了其在体外不能连续培养的不足,并满足了人们对种子细胞的需求,在实验和研究中具有重要意义。冻存过程中低温保护剂的种类、配法、降温复温的程序和时间等直接关系到细胞冻存的成败。DMSO 是常用的细胞保护剂,相对分子质量小,溶解度大,易穿透细胞膜,在细胞冷冻前保护细胞免受高浓度电解质的损害,同时水分不会过分外渗。本研究采用的冻存液对冻存复苏后的细胞活力、增殖以及多向诱导分化能力没有影响,在实际应用中具有可行性,这项研究为组织工程中具有潜力的种子细胞-hCDMSC 的大量及长期保存积累了实验资料。

#### 参考文献:

[1] Fehrer C, Lepperding G. Mesenchymal stem cell aging [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(12): 926-230.

[2] Parolini O, Caruso M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update [J]. *Placenta*, 2011, 32 Suppl 2: S186-195.

[3] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 300-311.

[4] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 649-658.

[5] 樊艳, 张卫泽, 陈永洁, 等. 成人脂肪间充质干细胞冻存前后的生物学特性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25): 4882-4886.

[6] 沙文琼, 王自能, 王冬菊. 人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的分离与纯化 [J]. *中国组织工程研究与临床康*

复, 2010, 14(10): 1833-1837.

[7] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1(4): 296-305.

[8] 刘志辉, 周延民, 万博蔚, 等. 体外定向诱导人胎盘源间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2010, 36(3): 500-507.

[9] Mohr S, Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, et al. Generation of an osteogenic graft from human placenta and placenta-derived mesenchymal stem cells [J]. *Reprod Sci*, 2010, 17(11): 1006-1015.

[10] Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(6): 1095-1107.

[11] Yen BL, Huang HI, Chien CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 3-9.

[12] Wang Y, Nathanson L, McNiece IK. Differential Hematopoietic Supportive Potential and Gene Expression of Stroma Cell Lines from Midgestation Mouse Placenta and Adult Bone Marrow [J]. *Cell Transplant*, 2010, Nov 5.

[13] 邹旭凤, 于润红, 刘玉峰. 胎盘间充质干细胞对骨髓、脐血、胎盘不同来源造血干细胞的体外扩增支持作用比较 [J]. *中国实用医刊*, 2009, 36(19): 32-33.

[14] 霍思维, 苏永锋, 刘元林, 等. 人胎盘间充质干细胞对脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞迁移作用的影响 [J]. *中国科学生命科学*, 2010, 40(5): 399-407.

[15] Nur Fariha MM, Chua KH, Tan GC, et al. Human chorion-derived stem cells: changes in stem cell properties during serial passage [J]. *Cytherapy*, 2011, 13(5): 582-593.

(收稿日期: 2011-02-16 修回日期: 2011-04-11)

(上接第 1732 页)

oxidant and anti-inflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1264-1269.

[6] Ma J, Hwang YK, Cho WH, et al. Macelignan attenuates activations of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B induced by lipopolysaccharide in microglial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(6): 1085-1090.

[7] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(3): 383-421.

[8] Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism [J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(1): 67-81.

[9] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1): 57-69.

[10] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated

neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 76(2): 77-98.

[11] McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(5): 741-749.

[12] Capasso R, Pinto L, Vuotto ML, et al. Preventive effect of eugenol on PAF and ethanol-induced gastric mucosal damage [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71 Suppl 1: S131-137.

[13] Morita T, Jinno K, Kawagishi H, et al. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(6): 1560-1565.

[14] Sonavane GS, Sarveiya VP, Kasture VS, et al. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71(1/2): 239-244.

[15] 王世飞, 安伟. COX-2、VEGF 在鼻息肉中的表达及其临床意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(8): 905-906.

(收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-01-28)