

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000080

人脐血清对人脐带血间充质干细胞生物学特征与衰老的影响

王 爽, 范振海, 刘祖林, 王钰莹, 方 宁, 喻皇飞, 刘金伟, 余丽梅

(遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 遵义 563003)

【摘要】目的:探讨人脐血清(human umbilical cord blood serum, CBS)对体外培养人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)基本生物学特征的影响。**方法:**密度梯度离心分离脐带血单个核细胞, 以含 3% CBS 加 7% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(CBS 组)或 10% FBS(FBS 组)的完全培养基培养 hUCB-MSCs, 流式细胞术检测细胞表面分子与细胞周期, 显微镜下测定细胞表面积和表达 β -半乳糖苷酶细胞百分率, MTT 法检测光密度值、绘制生长曲线。**结果:** CBS 组和 FBS 组均表达 CD44、CD105、CD90、CD73, 不表达 CD45、CD34、CD11b、CD19 和人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR), 但与 FBS 组比较, CBS 组表达 CD90 细胞百分率更低, G0/G1 期细胞比例较少, 细胞增殖指数较高($P < 0.05$)且细胞表面积也明显更小($P < 0.05$)。CBS 组生长曲线较 FBS 组左移, 峰值更高, 细胞倍增时间 48.37 h, FBS 组则为 54.43 h。FBS 组 β -gal 染色阳性细胞百分率明显高于 CBS 组($P < 0.05$)。**结论:**部分 CBS 合用 FBS 培养 hUCB-MSCs 能更好地促进细胞增殖, 并更好地保持 hUCB-MSCs 的基本生物学特征和延缓细胞的衰老。

【关键词】人脐血清; 脐带血间充质干细胞; 生物学特征; 衰老**【中图分类号】**Q813.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-04-02**作者简介:**王 爽, Email: wangshuang116@163.com,

研究方向: 干细胞生物学与衰老。

通信作者:余丽梅, Email: ylm720@sina.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 30860388)、遵义市重大科技项目培养与科技人才培养计划资助项目[编号: 遵科培(2009)02 号]。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000080.html>

- [9] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33132-33140.
- [10] Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J]. *Nature*, 1999, 398(6726): 422-426.
- [11] Li J, Sarosi I, Cattle RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia[J]. *Bone*, 2006, 39(4): 754-766.
- [12] 张 晓, 徐道晶, 黄 伟, 等. Wnt3a 协同 BMP9 调控间充质干细胞成骨分化及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(7): 565-568.
- [13] Xiang L, Liang C, Zhen-Yong K, et al. BMP9-induced osteogenic differentiation and bone formation of muscle-derived stem cells[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 610952.
- [14] Xu DJ, Zhao YZ, Wang J, et al. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J]. *BMB Rep*, 2012, 45(4): 247-252.
- [15] Li RD, Deng ZL, Hu N, et al. Biphasic effects of TGF beta1 on BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *BMB Rep*, 2012, 45(9): 509-514.
- [16] Huang E, Zhu G, Jiang W, et al. Growth hormone synergizes with BMP9 in osteogenic differentiation by activating the JAK/STAT/IGF1 pathway in murine multilineage cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(7): 1566-1575.
- [17] Liu G, Vijayakumar S, Grumolato L, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 67-75.

- [18] Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/beta-catenin Signaling in the treatment of osteoporosis[J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(2): 121-132.
- [19] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokines phingosine-1-phosphate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20764-20769.
- [20] Zhou S, Mizuno S, Glowacki J. Wnt pathway regulation by demineralized bone is approximated by both BMP-2 and TGF-beta1 signaling[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(4): 554-560.
- [21] Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, et al. Wnt/beta-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 145-156.
- [22] Yamamoto H, Sakane H, Michiue T, et al. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(1): 37-48.
- [23] Ke HZ, Richards WG, Li X, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases[J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(5): 747-783.
- [24] Heiland GR, Zwerina K, Baum W, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(12): 2152-2159.
- [25] Guo J, Liu M, Yang D, et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(2): 161-171.

(责任编辑: 冉明会)

Effects of human umbilical cord blood serum on the biological characteristics and senescence of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

Wang Shuang, Fan Zhenhai, Liu Zulin, Wang Yuying, Fang Ning, Yu Huangfei, Liu Jinwei, Yu Limei

(Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou, the Affiliated Hospital, Zunyi Medical College)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of human umbilical cord blood serum on the basic biological characteristics and senescence of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs). **Methods:** Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation from human umbilical cord blood. Two groups of hUCB-MSCs were cultured using different complete mediums, one consisting of 3% cord blood and 7% fetal bovine serum (CBS group), the other one consisting of 10% fetal bovine serum (FBS group). Cell surface moleculars and cell cycle were determined by flow cytometry. Then cell surface area and percentage of positive cells expressing β -galactosidase were detected. Absorbance value was measured by MTT methods, and cell growth curve was drawn. **Results:** hUCB-MSCs expressed CD44, CD105, CD90, CD73 and vimentin in both groups, but not CD45, CD34, CD11b, CD19 and human leukocyte antigen DR (HLA-DR). Percentage of CD90 expression in the 7th passage hUCB-MSCs was significantly lower in CBS group than in FBS group. Percentage of cells in G0/G1 phase was significantly lower and proliferation index was significantly higher. Cell surface area was significantly smaller in CBS group than in FBS group ($P < 0.05$). Growth curve of CBS group was shifted to the left with a higher peak. Cell doubling time was 48.37 h in CBS group, but 54.43 h in FBS group. Percentage of β -galactosidase positive cells was higher in FBS than in CBS group. **Conclusions:** hUCB-MSCs proliferation is promoted by combining partial human umbilical cord blood serum with fetal bovine serum with better maintenance of basic biological characteristic and delayed cell aging.

[Key words] human umbilical cord blood serum; umbilical cord blood mesenchymal stem cells; biological characteristic; senescence

间充质干细胞具有良好的增殖能力与多向分化潜能^[1],是细胞治疗和组织工程种子细胞的重要来源,除骨髓、脂肪等组织外,人脐带血也是重要的间充质干细胞来源,适当条件下间充质干细胞可诱导分化为 3 个胚层来源的多种细胞,如成骨细胞、软骨细胞、成脂细胞、肝脏细胞与神经细胞等^[2-3];人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)还具有免疫原性低、取材方便、伦理学争议少等优势;造血干细胞移植治疗中, hUCB-MSCs 还可促进造血干细胞归巢、定植与增殖,明显促进髓系与巨核系祖细胞扩增,抑制淋巴系祖细胞的造血作用^[4]。但目前 hUCB-MSCs 培养的成功率较低,原代培养时间长,体外扩增过程中,易出现细胞“老化”现象。为了提高 hUCB-MSCs 培养成功率,很多学者对其分离培养技术进行了探讨和改良,其中采用人脐血清(human umbilical cord blood serum, CBS)培养受到关注^[5]。本研究在实验室已建立的 2 种培养基“序贯”培养技术基础上,进一步探究 CBS 对 hUCB-MSCs 基本生物学特征及衰老变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM/F12 培养基(HyClone 公司), OHU-CMSC 培养基(Cyagen 公司), 胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS)(Gibco 公司), Ficoll 分离液(天津灏洋), 噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司), β -半乳糖苷酶(β -Galactosidase, β -gal)染色试剂盒(Mirus 公司), 羊抗人波形蛋白单克隆抗体(Sigma 公司), 间充质干细胞流式细胞术表型鉴定试剂盒 A (BD Bioscience 公司), 凯基细胞 DNA 含量检测试剂盒(凯基生物公司)。

1.1.2 脐血的采集 健康 36~40 周剖宫产新生儿脐血, 50~75 ml/份, 经产妇及其家属知情同意后由遵义市妇幼保健院妇产科采集, 产前产妇血清学检测排除乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒和 HIV 感染。200 U/ml 肝素抗凝无菌采集脐血, 4 h 内进行实验, 不抗凝脐带血用于 CBS 制备。

1.1.3 CBS 制备 不抗凝脐带血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, 血清析出后, 吸取血清, 2 000 r/min, 离心 10 min, 留取上清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取部分血清检菌, 无菌生长者用于细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 脐血单个核细胞分离与原代培养 按试剂盒说明书, 用 Ficoll 分离液从脐带血中分离单个核细胞, 离心后, 吸取细胞沉淀, 10% FBS DMEM/F12 培养基悬浮细胞, 0.4% 台盼蓝染色, 细胞活力 95% 以上, 按 5×10^6 个/ml 的细胞密度接种, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 饱和湿度下原代培养。5~7 d 后半量换液, 20~28 d 逐渐形成丰满的 hUCB-MSCs 集落, 以 3% CBS+7% FBS (CBS 组) 或 10% FBS (FBS 组) 的 OHUCMSC 培养基 1:2 传代培养。取对数生长期的第 7 代(the seventh passage, P7) hUCB-MSCs 进行检测。

1.2.2 hUCB-MSCs 鉴定 参照试剂盒说明于 hUCB-MSCs 悬液中加入 PE 标记的 CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DR 抗体和 CD44-PE、CD105-PerCP-CyTM5.5、CD90-FITC、CD73-APC 抗体及其同型对照, 孵育、洗涤、固定后, BD FACSCalibur

流式细胞仪检测, Cellquest 软件分析, 测定 hUCB-MSCs CD 分子表达百分率。另取 hUCB-MSCs 爬片, 滴加羊抗人波形蛋白抗体, 免疫细胞化学染色, 检测波形蛋白表达情况。

1.2.3 细胞表面积测量 hUCB-MSCs 爬片常规 HE 染色, 采用 Leica Q winV3 医学图像分析系统测量单个细胞表面积, 200 倍下, 每张玻片取 5 个视野, 每个视野测 10 个细胞, 测量 hUCB-MSCs 表面积, 计算平均值, 同时观察细胞形态变化。

1.2.4 β -gal 染色 hUCB-MSCs 爬片, 按照试剂盒操作说明, 37 $^{\circ}\text{C}$, 无 CO_2 条件下孵育 8 h, 染色细胞, 200 倍下每张图片随机选取 10 个视野, 计数 β -gal 染色阳性为蓝色的细胞数, 计算 β -gal 染色阳性细胞百分比。

1.2.5 绘制生长曲线 按 2×10^4 个/ml 密度, 接种 hUCB-MSCs 200 μl 于 96 孔培养板, 每组 4 个复孔, 每隔 24 h, MTT 法检测吸光度 (absorbance, A) 值, 连续 7 d。以时间为横坐标、平均 A 值为纵坐标绘制 hUCB-MSCs 生长曲线, 计算细胞倍增时间 (doubling time, Td): $\text{Td} = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$, t 为培养时间, N_0 及 N_t 为接种后及培养 t 小时测得的 A 值。

1.2.6 细胞周期检测 按照试剂盒操作说明, hUCB-MSCs 洗涤、固定, 加入 100 μl 牛胰核糖核酸酶, 孵育 30 min; 碘化丙啶染色, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育, BD FACSCalibur 流式细胞仪采集 1×10^6 个细胞检测, Cellquest 软件分析细胞周期, 计算增殖指数 (proliferation index, PI): $\text{PI} = (\text{S} + \text{G}2/\text{M}) / (\text{G}0/\text{G}1 + \text{S} + \text{G}2/\text{M}) \times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。率的比较采用校正卡方检验和 Fisher 确切概率法; 两样本均数组间比较进行 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 原代与 P5 hUCB-MSCs 形态特征

原代培养脐带血单个核细胞, 大部分细胞 2~3 d 贴壁, 形态不均一, 多为圆形或不规则形, 4~7 d 逐渐伸出突起; 14~16 d, 培养出扩增迅速的长梭形细胞和少量破骨样细胞。20 d 左右, hUCB-MSCs 呈集落样生长, 20~28 d 细胞融合 80%~90%, 传代培养。至 P3, 破骨样细胞基本去除, 为形态较为单一的长梭形细胞, 呈漩涡样排列 (图 1), P3~5 细胞增殖能力较强, 2 组细胞增殖速度与形态未见明显差异。

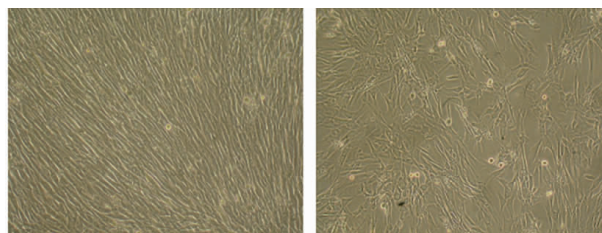


图 1 原代与 P5 hUCB-MSCs 的形态学变化 (40 $\times$)
Fig.1 Morphological changes of primary passage and P5 hUCB-MSCs (40 $\times$)

图 1 原代与 P5 hUCB-MSCs 的形态学变化 (40 $\times$)
Fig.1 Morphological changes of primary passage and P5 hUCB-MSCs (40 $\times$)

2.2 P7 hUCB-MSCs 形态特征

传代培养, CBS 组 P4~6 hUCB-MSCs, 未见明显形态与细胞生长速度差异, 但 P7 hUCB-MSCs, FBS 组生长速度明显较 CBS 组慢且 FBS 组细胞形态不均一, 除梭型细胞外, 还出现较多的多角形细胞且较多细胞胞体明显变大 (图 2)。



A. CBS 组 B. FBS 组

图 2 P7 hUCB-MSCs 形态学变化 (100 $\times$)

Fig.2 Morphological changes of P7 hUCB-MSCs (100 $\times$)

2.3 hUCB-MSCs 表型与波形蛋白表达

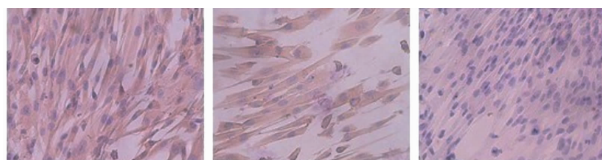
流式细胞术检测显示, 2 组 hUCB-MSCs 均高表达 CD44、CD73、CD105 和 CD90, 不表达 CD45、CD34、CD11b、CD19 和 HLA-DR (表 1)。CBS 组表达 CD90 阳性细胞百分率明显低于 FBS 组。2 组 hUCB-MSCs 胞浆内均可见棕色波形蛋白颗粒, 表达强度未见明显差异 (图 3)。

表 1 P7 hUCB-MSCs 免疫表型 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab.1 Immunophenotype of P7 hUCB-MSCs ($\bar{x} \pm s, n=4$)

表达 CD 分子细胞百分率 (%)	CBS 组	FBS 组
CD44+	99.43 $\pm$ 0.24	99.07 $\pm$ 0.58
CD73+	99.52 $\pm$ 0.25	99.63 $\pm$ 0.52
CD105+	82.77 $\pm$ 5.62	83.42 $\pm$ 2.80
CD90+	72.41 $\pm$ 1.03 ^a	83.92 $\pm$ 3.92
CD45+CD34+CD11b+CD19+HLA-DR+	0.61 $\pm$ 0.24	0.53 $\pm$ 0.40

注: a, 与 FBS 组比较, $P=0.001$



A. CBS 组 B. FBS 组 C. 空白片

图 3 P7 hUCB-MSCs 表达波形蛋白 ($n=4$) (100 $\times$)

Fig.3 Vimentin expression of P7 hUCB-MSCs ($n=4$) (100 $\times$)

2.4 hUCB-MSCs 表面积

hUCB-MSCs 细胞爬片 HE 染色后, Leica Q winV3 医学图像分析系统测量单个细胞表面积, 结果如表 2 所示, CBS 组 hUCB-MSCs 表面积明显较 FBS 组小 ($P<0.05$)。

表 2 P7 hUCB-MSCs 表面积 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab.2 Cell surface area of P7 hUCB-MSCs ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	细胞表面积 (μm^2 /个)
FBS 组	12 116.81 $\pm$ 1 839.55
CBS 组	9 099.05 $\pm$ 1 903.15 ^a

注: a, 与 FBS 组比较, $P=0.000$

2.5 β-gal 表达变化

β-gal 染色后,表达 β-gal 阳性细胞为胞浆内出现蓝色颗粒(图 4B 箭头所示),结果显示,CBS 组表达 β-半乳糖苷酶阳性细胞百分率明显低于 FBS 组($P<0.05$)(表 3)。

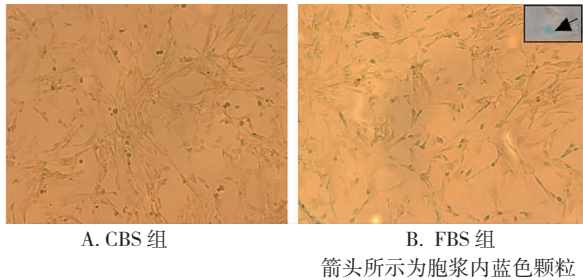


图 4 P7 hUCB-MSCs β-gal 表达情况 (β-gal 染色,100 ×)
Fig.4 β-gal expression of P7 hUCB-MSCs (β-gal staining,100 ×)

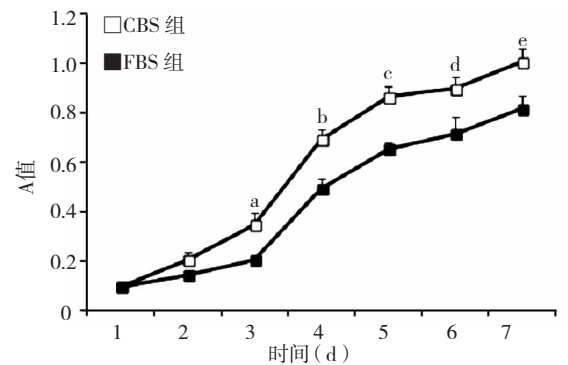
表 3 P7 hUCB-MSCs 表达 β-gal 阳性细胞百分率 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Tab.3 Percentage of β-gal positive cells of P7 hUCB-MSCs ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	阳性细胞百分率(%)
FBS组	20.30 ± 0.02
CBS组	7.35 ± 0.03 ^a

注:a,与 FBS 组比较, $P=0.000\ 2$

2.6 生长曲线

2 组细胞均于 2~7 d 处于对数增殖期,CBS 组 hUCB-MSCs 4~7 d 的扩增数量明显高于 FBS 组(表 4),CBS 组生长曲线左移(图 5),细胞增殖数量较高,细胞倍增时间为 48.37 h,而 FBS 组为 54.43 h。



与 FBS 组比较,a, $P=0.013$;b, $P=0.007$;c, $P=0.04$;d, $P=0.04$;e, $P=0.02$

图 5 P7 hUCB-MSCs 生长曲线
Fig.5 Growth curve of P7 hUCB-MSC

表 4 P7 hUCB-MSCs A 值 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Tab.4 A value of P7 hUCB-MSC ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
FBS组	0.096 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.003	0.49 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.71 ± 0.07	0.82 ± 0.05
CBS 组	0.097 ± 0.003	0.21 ± 0.03	0.35 ± 0.05 ^a	0.69 ± 0.04 ^b	0.86 ± 0.04 ^c	0.90 ± 0.04 ^d	1.00 ± 0.05 ^e

注:与 FBS 组比较,a, $P=0.013$;b, $P=0.007$;c, $P=0.04$;d, $P=0.04$;e, $P=0.02$

2.7 细胞周期分布

CBS 组 hUCB-MSCs G0/G1 期比例较 FBS 组低,G2/M 期比例则较高($P<0.05$)(图 6 和表 5),PI 为(41.06 ± 0.66)%,FBS 组 PI 为(20.89 ± 6.48)%。

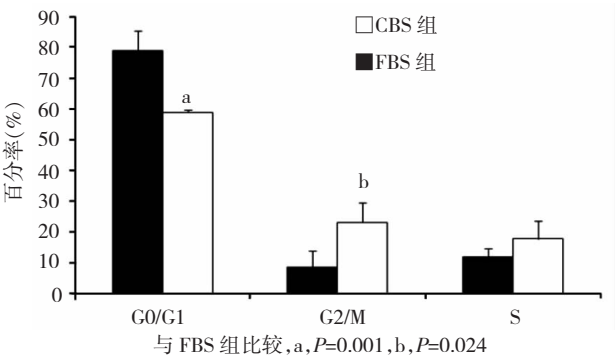


图 6 P7 hUCB-MSCs 细胞周期分布
Fig.6 Distribution of cell cycle of P7 hUCB-MSCs

表 5 P7 hUCB-MSCs 细胞周期各时期细胞百分比 (%)
Tab.5 Percentage of cells in different cell cycle phases of P7 hUCB-MSCs (%)

组别	G0/G1	G2/M	S
FBS组	79.11 ± 6.48	8.76 ± 5.13	12.12 ± 2.48
CBS组	58.94 ± 0.66 ^a	23.24 ± 6.43 ^b	17.82 ± 5.83

注:与 FBS 组比较,a, $P=0.001$;b, $P=0.024$

3 讨 论

优质 FBS 是干细胞培养中最常用的重要成分,CBS 用于 hUCB-MSCs 等培养,对细胞贴壁与增殖、细胞纯化与分化等效果满意,并可回避动物疾病在人类传播和体外细胞扩增易“老化”或易分化等^[9],这可能与 CBS 中含有大量促进细胞增殖、保持干细胞特性的细胞因子有关。但 CBS 存在采集量有限的问题,为更好地满足研究需求,并一定程度上克服上述矛盾,实验采用 3%CBS 与 7%FBS 混合培养基与 10%FBS 培养基比较,发现 FBS 组 hUCB-MSCs 从 P6 开始,出现细胞变大及形态的不均一;P7 FBS 组 hUCB-MSCs 表面积明显大于 CBS 组且生长速度减慢,倍增时间延长,而 CBS 组细胞形态与增殖速度尚无明显变化。尽管 2 组 P7 hUCB-MSCs 均高表达

CD44、CD73、CD105 和 CD90 和间质细胞标志波形蛋白,不表达 CD45、CD34、CD11b、CD19 和 HLA-DR,符合国际细胞治理协会等关于间充质干细胞的表型特征^[6],但 CBS 组 CD90 明显低于 FBS 组,表明多次传代后,CBS 能更好的保持 hUCB-MSCs 的形态学特征、表面标志及特征性胞浆蛋白且纯度高,提示其干细胞特性保持较好;而 FBS 组体外扩增一定代次后,不仅发生了表面标志的变化,也开始出现细胞“老化”的形态改变,这与文献报道使用 10% CBS 培养 hUCB-MSCs 有一定的相似之处^[7]。提示 CBS 与 FBS 所含营养成分及多种调控细胞增殖、分化、存活的细胞因子存在差异。

CD90 是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族的成员,表达于多种间充质干细胞、成纤维细胞与内皮细胞等,在细胞黏附和迁移、促进神经再生等方面发挥重要作用^[8]。FBS 组较 CBS 组存在更高比例的 CD90 阳性 hUCB-MSCs,可能是消化、传代时所观察到的 FBS 组贴壁更紧的一个原因。

体内外研究发现,人成纤维细胞、骨髓间充质干细胞与造血干细胞等,随传代次数的增加、培养时间的延长或在 D-半乳糖诱导“衰老”改变情况下, β -gal 染色阳性细胞百分率明显增加^[9-10]。不断积累的各种刺激所产生的应激产物,主要通过细胞的溶酶体进行分解和代谢,衰老细胞的溶酶体数量逐渐增加, β -gal 的表达量和表达细胞比率也会明显增加,故而 β -gal 表达的增加也被认为是细胞衰老相关的一个标志蛋白。FBS 组 P7 hUCB-MSCs 中 β -gal 阳性细胞比例明显高于 CBS 组,进一步证明,FBS 组 P7 hUCB-MSCs 已经出现较高比例的衰老细胞,而 CBS 组则明显较少。

细胞由 G0 期经 G1 期进入 S 期,细胞启动 DNA 合成^[11],进入增殖状态,显示 G1 期细胞比例减少,S 期细胞比例增加,PI 也随之增高。与 FBS 组不同,CBS 组 P7 hUCB-MSCs G1 期细胞比例下降,S 期和 G2/M 期细胞比例和 PI 均明显增高,说明 P7 CBS 组 hUCB-MSCs 处于良好的增殖分裂状态,反映该组细胞增殖能力更强,而 FBS 组细胞增殖周期的变化则与衰老细胞的变化相似。

综上所述,加入适量 CBS,一定代次内能更好地保持 hUCB-MSCs 基本生物学特征,更好地保持 hUCB-MSCs 体外扩增的数量和质量,而单纯 FBS 多代培养后,衰老细胞明显增高,即一定量的 CBS 加 FBS 培养 hUCB-MSCs 是一种更好的培养方案。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Wang LJ, Zhang YP, Wang JF, et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells in human umbilical cord blood and their supporting capacities index vivo expansion of CD34⁺ hematopoietic stem cells[J]. Chinese Journal of Hematology, 2005, 26(2): 65-68.
- [3] Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(4): 1153-1161.
- [4] Zhou DH, Huang SL, Zhang XC, et al. Effects of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on the expansion of CD34⁺ cells from umbilical cord blood[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2005, 43(7): 494-498.
- [5] Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y, et al. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures[J]. Cell Biol Int, 2006, 30(6): 521-524.
- [6] 付 蒙, 张艳梅, 王佃亮, 等. 人羊膜间充质干细胞的生物学特性及临床前研究[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(12): 115-119.
- [7] 赵春生, 王更银, 李俊峡. 人脐血间充质干细胞体外分离培养条件的优化及其鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(27): 5326-5330.
- [8] Majeti R, Becker MW, Tian Q, et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(9): 3396-3401.
- [9] Zhang DY, Wang HJ, Tan YZ. Wnt/ β -Catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21397.
- [10] 蔡世忠, 周 玥, 姜 蓉, 等. 小鼠造血干细胞衰老体内模型构建及相关生物学研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(4): 385-388.
- [11] Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control[J]. Gene, 2002, 299(1-2): 35-55.

(责任编辑: 关蕴良)