

· 基础研究 ·

骨髓基质干细胞 - 80 保存的初步研究

蓝旭,文益民,葛宝丰,刘雪梅

(解放军兰州军区总医院脊柱外科,甘肃 兰州 730050)

【摘要】目的:探索适合于人骨髓基质干细胞 - 80 冷冻保存的条件和方法。方法:体外分离培养人骨髓基质干细胞,以含不同浓度二甲亚砷的冻存液和不同细胞浓度 - 80 深低温保存。3个月后复苏接种培养,观察细胞形态、存活率和贴壁率;通过³H胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)掺入实验比较细胞分裂增殖能力;³H脯氨酸(³H-Proline)掺入实验检测胶原合成能力;RT-PCR法检测 I 型胶原和骨钙素 mRNA表达。结果:不同二甲亚砷浓度保存骨髓基质干细胞复苏后的细胞形态和功能有所不同,其中含 5%二甲亚砷冻存液组保存效果最差,15%组最佳。15%二甲亚砷冻存液组复苏后骨髓基质干细胞的形态与未冻存组相似,存活率为(85% ±3%),贴壁率为(81% ±5%)。骨髓基质干细胞保持较强的分裂增殖和胶原合成能力, I 型胶原和骨钙素 mRNA表达与 5%或 10%二甲亚砷冻存液组比较有统计学差异(P<0.05)。冻存骨髓基质干细胞浓度为(5~10) ×10⁶个/ml组复苏后细胞存活率明显优于(1~2.5) ×10⁶个/ml组。结论:含 15%二甲亚砷的冻存液适合于骨髓基质干细胞长期保存,高浓度组骨髓基质干细胞冻存效果优于低浓度组。

【关键词】 骨髓基质干细胞; 细胞,培养的; 低温保存; 二甲亚砷

A preliminary study of cryopreservation of marrow stromal cells at - 80 LAN Xu, WEN Yimin, GE Baofeng, LIU Xue mei Department of Spine Surgery, the General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To explore the condition and method for cryopreservation of marrow stromal cells (MSCs) at - 80 . **Methods:** Human MSCs were isolated, cultured and stored in cryopreservation medium of different dimethylsulfoxide (DMSO) concentration and different concentration of MSCs at - 80 in the condition of profound hypothermia After 3 months cryopreservation, the MSCs were thawed and inoculated for culture. The morphology, viability and attachment rate of MSCs were observed. The proliferative ability of MSCs was detected by ³H-TdR incorporation test, the collagen synthesis was studied by ³H-Proline incorporation test, the mRNA expression of type I collagen and osteocalcin was detected by RT-PCR technique. **Results:** There were differences in cell morphology and function between different DMSO concentration groups for cryopreservation of MSCs. The preservation effect was the worst after stored in 5% DMSO group and best in 15% DMSO group. The morphology of MSCs stored in 15% DMSO group was similar with the group without cryopreservation. The cell viability rate was (85% ±3%) and attachment rate was (81% ±5%). MSCs kept the better proliferative ability and collagen synthesis. The difference of mRNA expression of type I collagen and osteocalcin was significantly as compared with 5% and 10% DMSO group. The viability rate of MSCs in (5 - 10) ×10⁶/ml cryopreservation concentration was better than MSCs in (1 - 2.5) ×10⁶/ml. **Conclusion:** 15% DMSO cryopreservation solution is ideal for long-term preservation of MSCs, the cryopreservation effect of MSCs in high concentration is better than that in low concentration.

Key words Marrow stromal cells; Cells, cultured; Cryopreservation; Dimethylsulfoxide

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(11): 754-756 www. zggszz. com

骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)是目前组织工程骨的主要种子细胞,随着骨组织工程研究的不断深入,迫切需要有效的保存方法以促进组织工程骨在临床上的应用^[1]。本实验采用含不同二甲亚砷(dimethylsulfoxide, DMSO)浓度的保存液和细胞浓度,在-80下对人骨髓基质干细胞冷冻保存,从形态学和生物学方面进行比较,以期筛选出

合适的保存条件和方法。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 DMSO为美国 Sigma公司产品;达尔伯克氏必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium, DMEM培养基)、淋巴细胞分离液和胎牛血清为美国 Gibco公司产品,经灭活过滤除菌和去支原体处理;³H-TdR和³H-Proline购自中国原子能研究所;骨钙素 ELISA试剂盒为美国 Dako公司产品。

1.2 MSCs的分离培养与诱导 骨髓取自捐赠的 6月龄水囊引产胚胎,无菌条件下穿刺抽取四肢长管骨髓组织 10 ml,

基金项目:全军医学科学技术“十一五”计划课题基金资助项目(编号:06MA081)

通讯作者:蓝旭 Tel: 13919099916 E-mail: lzzyjw@sina.com

加入含肝素的 DMEM 培养液,混匀后加入 3 ml 淋巴细胞分离液,1 800 r/min 离心 10 min,吸除中间层细胞后再离心,所得细胞沉淀以 1×10^6 /ml 密度接种于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度条件下培养。待细胞相互融合达 90% 生长面积时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养。细胞传至 3 代时,移入含 10^{-8} mol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C 和 10^{-8} mol/L 磷酸甘油钠的 DMEM 培养液诱导培养 3 d,诱导后的细胞表型经鉴定为成骨样细胞。以 1×10^6 /ml 密度的 MSCs 接种于培养瓶中常规培养,基础培养液为含 15% 胎牛血清 DMEM 培养液。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度的孵箱中培养,24 h 后更换培养液,上清液离心后计数,计算贴壁率,以后每 24 h 后更换培养液 1 次。

1.3 MSCs 的冻存和复苏 以含 15% 胎牛血清 DMEM 培养液为基本冻存液,其中分别含 5%、10%、15% 和 20% 浓度的 DMSO (简称 5% DMSO 组、10% DMSO 组、15% DMSO 组和 20% DMSO 组)。将 5×10^6 个 /ml 的 MSCs 重悬于含 5% ~ 20% DMSO 的冻存液中,缓慢加入,轻轻摇匀。另以含 15% DMSO 的冻存液分别保存浓度为 (1×10^6)、(2.5×10^6)、(5×10^6)、(7.5×10^6)、(10×10^6) /ml 的 MSCs。具体的降温步骤如下:分装入 1 ml 冻存管,室温下放置 10 ~ 15 min,然后置于 4 $^{\circ}$ C 20 min,以 -1° /min 降至 -20° C,保存 30 min,再以 -1° /min 降至 -80° C,放入深低温冰箱保存。3 个月后取出冻存管,快速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 ~ 2 min,震荡直至细胞悬液完全融化。等倍缓慢稀释,共加入培养液 20 ~ 30 ml,4 $^{\circ}$ C、30 \times 离心 3 min,弃上清液,重新混悬于含 15% 胎牛血清 DMEM 培养液中,用台盼蓝拒染法计算细胞存活率。复苏 MSCs 的接种培养和贴壁率计算均同未冻存的空白对照组。

1.4 MSCs 功能检测

1.4.1 3 H-TdR 掺入实验 不同方法冻存的 MSCs 培养 24 h 细胞贴壁后,用无血清培养基相对同步化,至指数增殖期,每孔中加入 37 kBq 3 H-TdR,收集细胞于玻纤滤纸,用闪烁仪检测样品每分钟脉冲数,即 min^{-1} 值,结果以 6 孔均值表示。

1.4.2 3 H-Proline 掺入实验 不同方法冻存的 MSCs 按 5×10^4 孔接种于 24 孔培养板,同步化后每孔加入 0.6 ml 培养液,其中含 370 kBq 3 H-Proline,检测 min^{-1} 值,作对数转换后进行统计学分析。

1.4.3 RT-PCR 检测 型胶原 mRNA 表达 按 Taira 等^[2]的方法设计人 型胶原 1() 链的上、下游引物,上游引物为 CTGGTCTCGICACA GATCA,下游引物为 CTTTAAACGTTG-GAGGATGTGCTATTTGGC,扩增物大小为 235 bp。内对照基因选用 β -actin,上游引物为 TAA TAGTCACTCCAAGTATC,下游引物为 GAAGGTGGGGTATTTA TGAG,扩增物大小为 535 bp。细胞同步化后,按 High Puke RNA Isolation Kit 试剂盒提供的方法提取总 RNA,Superscript System 试剂盒方法进行逆转录反应,采用 PCR Reagent System 进行 PCR 反应。

1.4.4 RT-PCR 检测 OC mRNA 表达 细胞同步化后,按 Frank 等^[3]的方法设计 OC 引物,上游引物为 ATGAGGCCCT-CACACTCTC,下游引物为 CTAGACCGGGCGTAAAGCG,扩增物大小为 303 bp,内对照基因选用 β -actin,上游引物为 TAA TAGTCACTCCAAGTATC,下游引物为 GAAGGTGGGG-

TATTTA TGAG,扩增物大小为 535 bp。

1.5 统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件包对检查结果行多个样本均数的方差分析和两两比较的 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冻存前后 MSCs 形态结构变化 倒置显微镜下观察,15% DMSO 组 MSCs 贴壁率高,细胞生长旺盛,细胞膜完整,胞浆内有丰富的颗粒,可见较多双核细胞,核仁清楚,少数细胞内出现空泡,与空白对照组 MSCs 的形态相似。5% DMSO 组 MSCs 细胞形态最差,未见双核细胞。

2.2 MSCs 存活率和贴壁率

(1) 刚分离收集的 MSCs 存活率为 (92% \pm 5%),24 h 贴壁率为 (88% \pm 6%)。复苏 MSCs 的存活率和 24 h 贴壁率见表 1。实验组存活率或贴壁率经统计学分析,15% 或 20% DMSO 组分别与 5% 或 10% DMSO 组比较,有统计学差异 ($P < 0.05$)。15% DMSO 组与 20% DMSO 组比较,无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 1 冻存复苏后骨髓基质干细胞的存活率与贴壁率 ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab 1 The viability and attachment rate of MSCs cryopreserved and thawed ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)

项目	5% DMSO 组	10% DMSO 组	15% DMSO 组	20% DMSO 组
存活率	51 \pm 3	71 \pm 4	85 \pm 5*	81 \pm 5
贴壁率	31 \pm 6	70 \pm 6	81 \pm 4*	78 \pm 6

注:与 5% 和 10% DMSO 组比较,* $P < 0.05$

Note: As compared with the group 5% and 10% DMSO,* $P < 0.05$

(2) 冻存细胞浓度为 (1×10^6)、(2.5×10^6)、(5×10^6)、(7.5×10^6)、(10×10^6) /ml 的 MSCs 复苏后存活率分别为 (64% \pm 5%)、(71% \pm 6%)、(86% \pm 5%)、(81% \pm 3%)、(79% \pm 5%),细胞浓度为 ($5 \sim 10$) $\times 10^6$ /ml 组复苏后存活率明显优于 ($1 \sim 2.5$) $\times 10^6$ /ml 组 ($P < 0.05$),但 ($5 \sim 10$) $\times 10^6$ /ml 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 MSCs 功能检测

2.3.1 3 H-TdR 掺入实验 5%、10%、15% 和 20% DMSO 组 min^{-1} 值分别为 (279.12 \pm 30.83)、(302.37 \pm 18.72)、(375.19 \pm 15.47)、(362.13 \pm 25.77), $F = 8.426$ 。经统计学分析,15% 或 20% DMSO 组分别与 5% 或 10% DMSO 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3.2 3 H-Proline 掺入实验 5%、10%、15% 和 20% DMSO 组 min^{-1} 值分别为 (6.429 3 \pm 0.019 7)、(7.325 6 \pm 0.019 2)、(9.735 6 \pm 0.019 4)、(9.723 5 \pm 0.012 9), $F = 24.756$ 。经统计学分析,15% 或 20% DMSO 组分别与 5% 或 10% DMSO 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3.3 型胶原 mRNA 表达结果 型胶原 mRNA 与 β -actin mRNA 比值,5%、10%、15% 和 20% DMSO 组 min^{-1} 值分别为 (3.800 \pm 0.600)、(4.200 \pm 0.655)、(12.300 \pm 1.500)、(8.300 \pm 0.955), $F = 41.253$ 。经统计学分析,15% DMSO 组分别与 5%、10% 或 20% DMSO 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组 MSCs 表达 型胶原 mRNA 的强弱关系依

次为 15% DMSO组 > 20% DMSO组 > 10% DMSO组 > 5% DMSO组。

2.3.4 OCmRNA 表达结果 OCmRNA 与 β -actin mRNA 比值, 5%、10%、15%和 20% DMSO组 min^{-1} 值分别为 (1.126 7 \pm 0.289 6)、(1.573 2 \pm 0.531 5)、(3.639 7 \pm 0.435 2)、(2.523 3 \pm 0.265 4), $F=32.253 6$ 。经统计学分析, 15% DMSO组分别与 5%、10%或 20% DMSO组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组 MSCs细胞表达 OCmRNA的强弱关系依次为 15% DMSO组 > 20% DMSO组 > 10% DMSO组 > 5% DMSO组。

3 讨论

超低温保存是储存种子细胞的重要方法, 目前认为: 冻存效果主要与降温复温速率、冻存剂种类和浓度、冻存前细胞活力和功能等方面有关^[4]。降温步骤是成功进行细胞低温保存的关键, 降温速度直接影响细胞内外水分结冰的先后顺序, 进一步影响细胞内外渗透压。目前认为冻存细胞的损伤主要为“溶质反应”所致, 后者引起渗透压和 pH值变化导致细胞膜渗漏, 复苏时水分进入细胞内, 造成细胞水肿变性而死亡^[5]。如降温速度过快, 细胞内外都形成冰晶, 造成细胞器损伤、染色质空间构型改变和细胞内蛋白质变性而导致细胞死亡。如降温速度过慢, 细胞外的水分预先结冰, 细胞内外渗透压差过大造成细胞膜受损, 大分子物质外漏而导致细胞死亡。分阶段降温比匀速降温对细胞影响小, 目前国内外多采用分阶段降温措施, 降温速度在 1~1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 可较好保持细胞活力和功能^[6]。选择适宜的冻存剂有助于细胞克服低温保存过程中细胞内外渗透压剧烈变化引起的损伤, 长期冻存细胞常采用的 DMSO是一种小分子量、渗透性强的化学物质, 是目前最常采用的细胞冻存保护剂^[7]。其作用机制是: DMSO在细胞冷冻前渗透到细胞内, 可降低培养液冰点并防止游离蛋白质聚集, 提高细胞膜对水的通透性。水分在冻结前透出细胞外并形成冰晶, 从而减少细胞内冰晶形成, 提高细胞复苏后存活率; 冷冻前渗透到细胞内的 DMSO在细胞内外产生一定的摩尔浓度, 降低细胞内外未结冰溶液中电解质浓度, 从而保护细胞免受高浓度电解质损伤, 同时细胞内水分不会过度外渗, 避免细胞结构过度脱水皱缩^[8]。

本研究在血清浓度和降温复温速度等条件相同情况下, 采用不同 DMSO浓度的冻存液对人 MSCs在液氮中长期保存, 复苏后接种培养, 观察其生长情况、形态结构和细胞功能。

结果显示 15% DMSO组保存效果最佳, 该组冻存 3个月后再接种培养的 MSCs生长和代谢等功能均类似于未冻存 MSCs, 而且明显优于 5%和 10% DMSO组。当 DMSO浓度增至 20%时, 复苏后细胞活力反而稍有下降。推测原因, 可能与高浓度的冻存剂引起较高的细胞外渗透压有关^[8]。因此, 15% DMSO浓度作为长期冻存 MSCs的冻存保护剂较为适宜。此外, 对不同细胞浓度的 MSCs进行冻存时发现, 高细胞浓度组的保存效果优于低细胞浓度组。当细胞浓度低于 $2.5 \times 10^6 / \text{ml}$ 时, 复苏后细胞的存活率显著降低, 但当细胞浓度大于 $5 \times 10^6 / \text{ml}$ 时, MSCs细胞活力也未明显增加。说明冻存细胞浓度对冻存效果有较大影响, 细胞浓度太低, 复苏后细胞活力明显下降。进一步优化 MSCs的冻存技术, 可使复苏后的 MSCs保持较好的细胞活力和功能。及时有效保障种子细胞的数量和质量, 则建立能制备、保存和提供组织工程骨的综合骨库在不远的将来有可能成为现实。

参考文献

- 1 金黎明, 刘万顺, 韩宝芹, 等. 骨组织工程中种子细胞的选择. 中国骨伤, 2003, 16(5): 318-320.
- 2 Taira M, Toyosawa S, Ijyuin N, et al. Studies on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured in type I collagen gel by RT-PCR analysis. J Oral Rehabil, 2003, 30(8): 802-807.
- 3 Frank O, Heim M, Jakob M, et al. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. J Cell Biochem, 2002, 85(4): 737-746.
- 4 Kofron MD, Opsitnick NC, Attawia MA, et al. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone. J Orthop Res, 2003, 21(6): 1005-1010.
- 5 Windrum P, Morris TC, Drake MB, et al. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. Bone Marrow Transplant, 2005, 36(7): 601-603.
- 6 Gole MD, Poulsen D, Marzo JM, et al. Chondrocyte viability in press-fit cryopreserved osteochondral allografts. J Orthop Res, 2004, 22(4): 781-787.
- 7 Kotobuki N, Hirose M, Machida H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. Tissue Eng, 2005, 11(5-6): 663-673.
- 8 Li H, Zou X, Woo C, et al. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract. Spine, 2005, 30(8): 890-896.

(收稿日期: 2006-11-30 本文编辑: 李为农)

本刊对来稿中照片图处理的有关要求

本刊对稿件中的图片要求有良好的清晰度和对比度, 最好提供洗印好的照片。X线片图请一律寄照片, 不可寄 X线胶片, 图片不小于 8 cm \times 12 cm, 肢体照片需包括一端关节。图中需标注的符号 (包括箭头) 请用另纸标上, 不要写在照片上。每幅图的背面应贴上标签, 注明图号、作者姓名及图的上下方向。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图片如有引自他刊者, 应注明出处。图片均不可粘贴, 另纸包好, 以免污染或折损。大体标本照片在图内应有尺度标记。如提供电子版的图片, 彩色图片应为 RGB格式, 建议作者使用数码相机拍摄照片时, 图片分辨率最小为 300 ppi (像素/英寸), 线条图最小 1 200 ppi, 图像大小 5 in \times 7 in (127 mm \times 178 mm)。图片应按其在正文中出现的顺序命名, 采用 JPEG格式单独存储, 请勿插入正文文档中 (如 Word文档)。若刊用人物像, 应征得本人的书面同意, 或遮盖其能被辨认出系何人的部分。

《中国骨伤》杂志社