

## 研究论文

# 长期传代培养对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响

张权<sup>1</sup> 张亚奇<sup>2</sup> 饶巍<sup>1</sup> 周端鹏<sup>1</sup> 韩兵<sup>1</sup> 武栋成<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心, 武汉 430075; <sup>2</sup>武汉大学基础医学院, 武汉 430072)

**摘要** 该课题研究长期体外传代培养对人脐带间充质干细胞重要生物学属性的影响。采用组织块法分离人脐带间充质干细胞, 体外反复传代培养后比较第5、10、20代细胞的主要生物学属性: 采用细胞计数法与流式细胞仪检测不同代次细胞增殖活性和表面免疫标志物; 染色体常规核型分析和微阵列分析检测其基因稳定性; 成脂、成骨诱导分化检测其多向分化潜能; 定量RT-PCR检测端粒酶反转录基因*hTERT*的表达; SA- $\beta$ -gal活性确定细胞老化状态。第5、10、20代脐带间充质干细胞呈现相同的增殖曲线, 各代次干细胞的增殖速率无显著性差异。不同培养代次的脐带间充质干细胞表面均呈现CD105、CD90、CD44、CD73高表达, CD19、CD34、CD45及HLA-DR不表达或低表达。基因稳定性分析证实三个代次干细胞均为正常二倍体核型, 染色体基因组未发生基因拷贝数缺失、重复和大片段纯合子现象。成脂和成骨分化潜能以及*hTERT*表达均未见显著性差异。SA- $\beta$ -gal活性检测显示, 随培养代次的增加, 脐带间充质干细胞开始呈现衰老征象, 尤以第20代明显。体外反复传代长期培养对人脐带间充质干细胞的基本生物学属性、基因稳定性及其多向分化潜能均无显著性影响。过度长期培养有可能导致干细胞老化, 活性降低。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; 长期培养; 基因稳定性; 诱导分化

## Characterization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells after Long-Term Expansion

Zhang Quan<sup>1</sup>, Zhang Yaqi<sup>2</sup>, Rao Wei<sup>1</sup>, Zhou Duanpeng<sup>1</sup>, Han Bing<sup>1</sup>, Wu Dongcheng<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Wuhan Hamilton Biotechnology-Co., LTD, Wuhan 430075, China;<sup>2</sup>Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract** The purpose of this study is to evaluate the effects of long-term *in vitro* expansion on the stability and functions of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). The hUC-MSCs were isolated from Wharton's jelly and *in vitro* cultured till passage 20. The hUC-MSCs at passage 5, 10, 20 were selected to compare their proliferation capacity, immunophenotype, genomic stability, multi-differentiation potency, telomerase activity and senescence. Proliferation capacity of the hUC-MSCs at passage 5, 10, 20 remained no significant change. Long-

收稿日期: 2018-04-18 接受日期: 2018-11-26

武汉市“3551光谷人才计划”资助项目(批准号: 武新管[2017]129号)、武汉市科技局应用基础研究计划资助项目(批准号: 2017060201010201)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 027-87276298, E-mail: bcdewu@hotmail.com

Received: April 18, 2018 Accepted: November 26, 2018

This work was supported by the 3551 Optical Valley Talents Plan of Wuhan City (Grant No.WXG[2017] No.129) and the Applied Basic Research Program of Wuhan Science and Technology Bureau (Grant No.2017060201010201)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-87276298, E-mail: bcdewu@hotmail.com

网络出版时间: 2018-12-28 13:51:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1351.006.html>

term expansion of hUC-MSCs had no effect on their immunophenotype determined by expression levels of the cell surface markers, karyotype and chromosomal microarray analysis showed genomic stability, and *hTERT* expression showed similar telomerase activity. Furthermore, the multi-differentiation potency of the hUC-MSCs still remained strong after long-term culture, demonstrated by adipogenic and osteogenic induction. However, an increase of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity was observed over time. All the major biological characters and functions of hUC-MSCs remain unchanged after long-term *in vitro* expansion. However, hUC-MSCs cultured over 10 passages may have a reduced cell activity due to increasing senescence, therefore, hUC-MSCs cultured less than 10 passages are suitable for clinical research/therapy.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells; long term culture; genomic stability; differential potency

干细胞是一类具有自我更新复制和多向分化潜能的未分化细胞, 可以诱导分化成多种组织类型的细胞, 在促进生物体内成体器官组织的自我更新和损伤修复过程中扮演着不可替代的重要角色<sup>[1]</sup>。在疾病与衰老状态下, 生物体内的干细胞往往存在再生修复功能降低或数量不足的状况, 需要通过输注经体外培养扩增的自体或异体干细胞加以改善。因此, 干细胞疗法已经并越来越受到广泛的重视和应用, 为治疗许多难治性疾病、延缓衰老和恢复亚健康提供了新的希望。

在各类不同种类的干细胞中, 起源于胚胎中胚层的间充质干细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSC)因其组织来源广泛、取材容易、具有明确的自我更新与多向分化潜能以及免疫调节作用而得到越来越广泛的应用。其中, 人脐带来源间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)作为更为“年轻”的成体间充质干细胞, 具备有出生前和出生后MSC的综合优点而受到越来越广泛的关注。与其他来源(如骨髓、脂肪)成体间充质干细胞相比, hUC-MSCs的基因表达更接近于胚胎干细胞, 表现出更高的细胞增殖活性和分化潜能<sup>[2-3]</sup>; 同时, hUC-MSCs因其不表达或低表达与组织相容相关的免疫分子, 动物安全性评价不具成瘤性, 是十分理想的干细胞疗法应用细胞<sup>[4]</sup>。人脐带间充质干细胞的其他优点包括: 取自新生儿, 细胞质量不存在年龄因素的影响; 取材容易, 对母婴无痛无害, 无伦理障碍; 细胞分离操作简便, 体外培养扩增效率更高, 可以从同一来源短期内获得足够数量的、高质量高纯度的、可用于临床研究和治疗的干细胞。因此, 人脐带间充质干细胞更适用于作为干细胞药物进行批量规模化开发。

既往研究显示, 过度的体外长期传代培养可以引起DNA复制压力和染色体缩合缺陷, 进而诱发干细胞高频率的基因突变<sup>[5]</sup>。人脐带间充质干细胞经体外长期传代培养后是否仍能保持其干细胞的基本生物学特性、基因稳定性和多向分化潜能等仍存在争议, 仍有待进一步全面系统的研究<sup>[6-7]</sup>。我们将分离的hUC-MSCs进行长期传代培养, 选取第5、10、20代细胞, 全面比较了不同代次的细胞生物学特性、基因稳定性及诱导分化潜能等, 以探讨体外长期传代培养对干细胞局部生物学属性的影响, 为体外培养扩增的人脐带间充质干细胞的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 脐带组织 新鲜脐带采集于足月健康剖腹产新生儿, 由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。脐带采集前产妇产前经筛选无家族遗传病史, 无传染病史并且HBV、HCV、HIV、梅毒检测阴性。脐带采集后于4 °C保存, 6 h内完成华通氏胶分离培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 无血清干细胞专用培养基购自日本Lonza公司; DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶、L-谷氨酰胺、PBS、核型专用培养基均购自美国Gibco公司; 荧光标记的鼠抗人CD105-FITC、CD90-PE、CD44-PE、CD73-FITC、CD19-PE、CD34-FITC、CD45-PE和HLA-DR-PE单克隆抗体均购自美国BioLegend公司; DMSO购自美国AMRESCO公司; 干细胞成脂、成骨诱导培养基购自深圳伟通生物科技有限公司; 冰乙酸、甲醇购自国药集团化学试剂有限公司; 秋水仙素、Giemsa染液、双抗、 $\beta$ -巯基乙醇、丁羟基茴香醚、地塞米

松、 $\beta$ -甘油磷酸钠和抗坏血酸购自德国Sigma公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; 细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司。荧光定量PCR引物由天一辉远生物科技有限公司合成。倒置显微镜购自重庆澳浦光电有限公司; 流式细胞仪购自美国Beckman公司; 自动细胞计数仪购自Nexcelom Bioscience LLC公司; 细胞培养箱和生物安全柜购自Heal Force公司; 离心机购自KUBOTA公司; 定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 hUC-MSCs的分离与培养** hUC-MSCs的分离培养采用自主研发的人脐带间充质干细胞分离培养方法<sup>[8]</sup>进行。收集分离的原代hUC-MSCs, 以 $2.5 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种培养于无血清干细胞专用培养液中, 当细胞生长至融合度80%~90%时, 常规胰酶消化收集细胞, 反复传代培养。收集第5、10、20代hUC-MSCs建库, 液氮冻存备用。

**1.2.2 hUC-MSCs免疫标记鉴定** 收集的不同代次(第5、10、20代)hUC-MSCs, PBS洗涤后, 制备 $6 \times 10^6$ 细胞/mL的细胞悬液。将细胞悬液按100  $\mu$ L/管( $5 \times 10^5$ 细胞)分装, 分别加入5  $\mu$ L不同荧光素标记的CD105、CD90、CD44、CD73、CD19、CD34、CD45及HLA-DR单克隆抗体, 轻微震荡混匀, 避光室温孵育30 min; PBS洗涤2遍, 加500  $\mu$ L PBS重悬细胞, 流式细胞仪检测hUC-MSCs表面抗原<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 hUC-MSCs的增殖活性研究** 将不同代次(第5、10、20代)hUC-MSCs按每孔 $3 \times 10^4$ 个细胞接种于6孔细胞培养板中, 使用无血清的间充质干细胞培养基进行培养。每天收集3孔不同代次hUC-MSCs计数, 绘制细胞增殖曲线<sup>[9]</sup>。

**1.2.4 hUC-MSCs核型分析** 取不同代次(第5、10、20代)的hUC-MSCs, 于含有刀豆蛋白的核型分析专用培养基中37 °C培养48~72 h, 加入秋水仙碱(终浓度40 mg/mL)继续培养4 h; 刮取贴壁细胞, 收集细胞悬液1 800 r/min离心8 min, 弃上清; 加入4 mL低渗KCl, 37 °C水浴5 min, 加入2 mL固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)继续水浴5 min, 1 800 r/min离心8 min, 弃上清; 加入4 mL的固定液重悬细胞, 室温条件下固定5 min, 制备细胞滴片; 将细胞滴片于室温下放置48 h, 75 °C烘烤4 h; 将烤制细胞滴片置于37 °C水浴预热的

0.25%胰酶中消化30 s, 再置于生理盐水中清洗2遍, Giemsa染色10 min, 自来水冲洗除去多余的染料后烘干备用; 显微镜下观察并进行染色体核型分析<sup>[10]</sup>。

**1.2.5 染色体微阵列分析(Chromosomal Microarray Analysis, CMA)** 不同代次(第5、10、20代)hUC-MSCs核型的分子水平鉴定采用Affymetrix公司CytoSanHD/CytoSan750K芯片进行染色体全基因组微阵列扫描分析(chromosomal microarray analysis, CMA)。实验分析全过程采用该公司配套的检测试剂盒, 严格按照优化的操作流程与质控标准进行。

**1.2.6 hUC-MSCs成脂与成骨细胞诱导分化** 取生长良好的第5、10、20代hUC-MSCs, 以 $1 \times 10^3$ 细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种到24孔板中。待细胞完全贴壁后分别更换成脂或成骨诱导培养基, 每3~4天换液一次, 成脂诱导培养14天及成骨诱导21天后PBS漂洗细胞, 4%多聚甲醛固定10 min, 分别加入油红O工作液或0.1%茜素红染色; 镜检观察, 以不加诱导液常规培养的hUC-MSCs为对照组<sup>[11]</sup>。同时, 成脂诱导培养14天及成骨诱导培养21天后, 吸去培养基, PBS清洗1次, 每孔加入TRIzol试剂1 mL, 反复吹打溶解细胞, 提取RNA备用。按逆转录试剂盒说明书操作合成cDNA, 并经荧光定量PCR法检测与细胞分化类型相关的特征性基因(成脂: *PPAR $\gamma$* 、*c/EBP- $\alpha$* 、*Pref-1*; 成骨: *Runx2*、*OPN*、*ALP*等)的表达情况。相关引物序列详见表1。

**1.2.7 hUC-MSCs端粒酶活性的分析** 人端粒酶反转录酶(*hTERT*)在不同代次hUC-MSCs中的表达采用定量RT-PCR方法检测<sup>[12]</sup>。TRIzol提取不同代次(第5、10、20代)hUC-MSCs的总RNA, 按照PrimeScript™ RT Reagent Kit所制定的步骤除去基因组DNA污染, 合成cDNA。采用荧光定量PCR检测*hTERT*表达(sense primer: 5'-TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC-3', antisense primer: 5'-CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC-3'), 设定PCR反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 第2步至第4步重复40个循环。最后进行熔解曲线分析, 并参照*GAPDH*(house-keeping gene)的表达水平计算出其相对表达水平。

**1.2.8  $\beta$ -半乳糖苷酶染色(SA- $\beta$ -gal)检测hUC-MSCs衰老状况** 取消化计数后hUC-MSCs, 以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔接种于6孔板上, 细胞培养3天达到90%的融合度后, 去除培养液, 用PBS清洗3次, 然后用固定液

表1 成脂、成骨基因qRT-PCR引物序列  
Table 1 qRT-PCR primers for expression of adipogenic and osteogenic genes

基因 Genes	引物 Primer	引物序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC
	GAPDH-R	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	PPARA-F	GGA GAC ACT GTG TAT GGC TG
	PPARA-R	TGC ACT GGC AGC AGT GAA AG
<i>c/EBP-<math>\alpha</math></i>	c/EBP- $\alpha$ -F	CCG CCT TCA ACG ACG AGT TC
	c/EBP- $\alpha$ -R	TAG TCA AAG TCG CCG CC
<i>Pref-1</i>	Pref-1-F	AGA GAT GAC CGC GAC CGA AG
	Pref-1-R	AGC ATT CAG CCC CAT AGG TG
<i>Runx2</i>	Runx2-F	GGT ACC AGA TGG GAC TGT G
	Runx2-R	CAT AAC AGC AGA GGC ATT CC
<i>OPN</i>	OPN-F	TTC TGG GAG GGC TTG GTT GTC
	OPN-R	TTG GTC GGC GTT TGG CTG AG
<i>ALP</i>	ALP-F	ATG GAC CGC TTC CCA TAT GTG
	ALP-R	TCT GGA AGT TGC CCT TGA CC

(4%甲醛)室温固定5 min, 再用PBS冲洗3次, 每孔加X-gal染色液在37 °C孵育16~24 h<sup>[13]</sup>。在倒置显微镜下观察蓝色的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞, 并拍照记录。

1.2.9 统计学分析 所有统计数据均采用SPSS 22.0统计软件进行统计学处理。实验数据用平均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)表示, 对两组间数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同代次hUC-MSCs的形态学观察与表面免疫标志物鉴定

同一来源的第5、10、20代hUC-MSCs的生物学特征均符合国际细胞疗法协会(The International Society for Cellular Therapy, ISCT) 2006年所制定的间充质干细胞的形态学与表面免疫标志物的鉴定特征<sup>[14]</sup>。所有代次的hUC-MSCs均呈贴壁生长。镜下观察发现, 第5代和第10代hUC-MSCs的细胞形态与排列完全相同, 类似于成纤维细胞, 呈长梭形流水状生长; 第20代细胞依旧保持同样的细胞形态与生长特征, 但局部细胞胞体似有所增大, 细胞排列紊乱(图1)。

流式细胞仪检测结果显示, 所有不同代次hUC-MSCs的表面标记CD105、CD90、CD44与CD73均呈高表达(阳性率均在98%以上), 而不表达或低表达CD19、CD34、CD45及HLA-DR(阳性率 $< 2\%$ ), 完全符合国际细胞疗法协会所制定的间充质干细胞表面

免疫标志物的鉴定标准<sup>[14]</sup>。结果证明, 体外长期传代培养对hUC-MSCs表面标记表达无显著性影响(图2)。

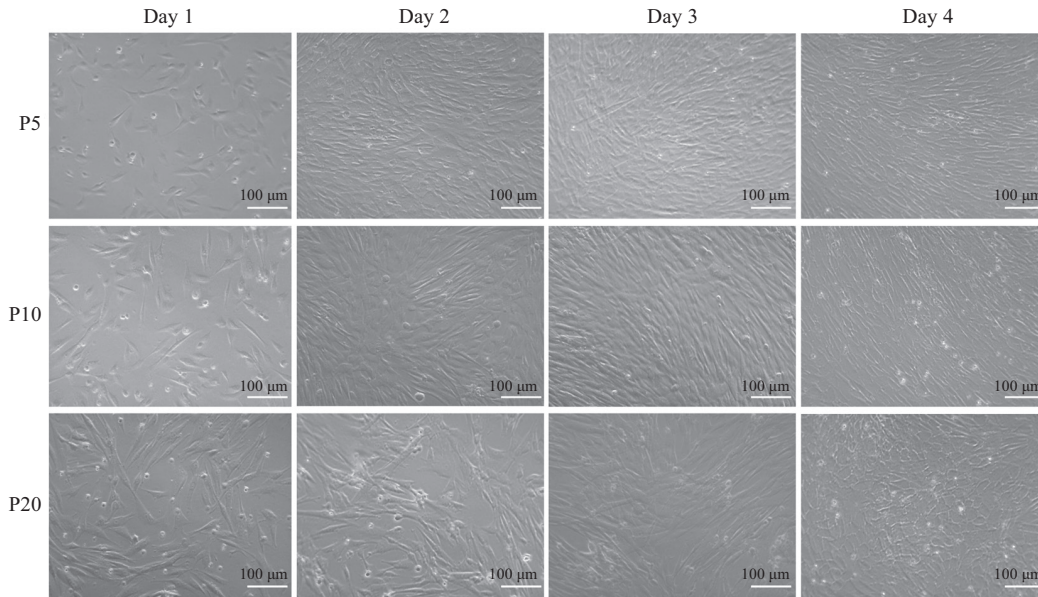
### 2.2 不同代次hUC-MSCs的增殖活性比较

采用细胞计数法对不同代次hUC-MSCs的增殖活性进行比较。以不同时间细胞计数所绘制的细胞增殖曲线显示, 脐带间充质干细胞以对数生长至培养的第4天, 然后进入缓慢增长期(图3)。不同代次的脐带间充质干细胞生长曲线相似, 增殖活性无显著性差异( $P > 0.05$ ,  $n = 3$ )。

### 2.3 长期体外培养对hUC-MSCs基因稳定性影响

干细胞临床研究应用的另一个十分重要的考量因素是其基因稳定性, 即经过体外传代培养的干细胞是否会发生染色体基因畸变, 导致非预期分化或恶性转化。为确定hUC-MSCs的基因稳定性, 我们对第5、10、20代传代培养的hUC-MSCs进行了常规染色体核型分析和染色体微阵列分析。常规染色体核型分析显示, 不同代次的hUC-MSCs均为正常双倍体核型(46, XY)。hUC-MSCs传代至第20代未发现染色体的缺失、重复、倒位、异位、增多等畸形改变(图4)。

为更精确地分析干细胞的基因稳定性, 我们采用CytoScan HD高密度芯片, 包括270万个探针(195万个拷贝数探针和75万个SNP探针), 无遗漏地均匀分布于人类基因组整个范围, 并加密覆盖拷贝数多变区、遗传疾病关联区、基因分布区等。完全覆盖ISCA(International Standards for Cytogenomic Arrays)

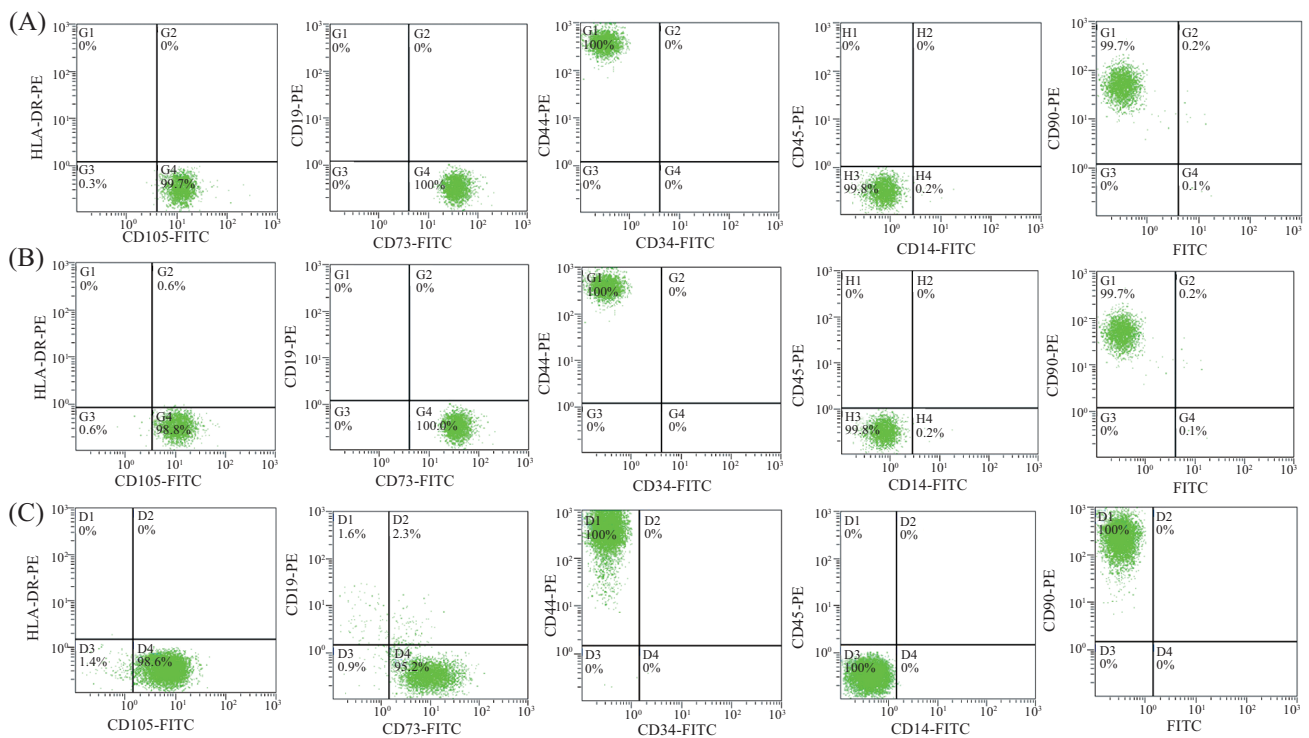


体外传代培养至第5、10代hUC-MSCs呈现完全相同的细胞形态与生长排列方式,均呈现长梭状贴壁生长,轻度螺旋流水状排列。第20代细胞呈现非常相似的长梭状贴壁生长,但胞体略显增大,融合后局部排列紊乱。

hUC-MSCs were *in vitro* serum-free cultured till to 20 passages. Comparing to the hUC-MSCs at passage 5, the cells at passage 10 remain a same adherent growing pattern with fibroblast-like morphology and slightly circle arrangement; the cells at passage 20 maintain a similar growing pattern and morphology, but with some cells flattening and local arrangement disordering.

图1 不同代次人脐带间充质干细胞的形态学观察

Fig.1 Morphology of hUC-MSCs at different passages

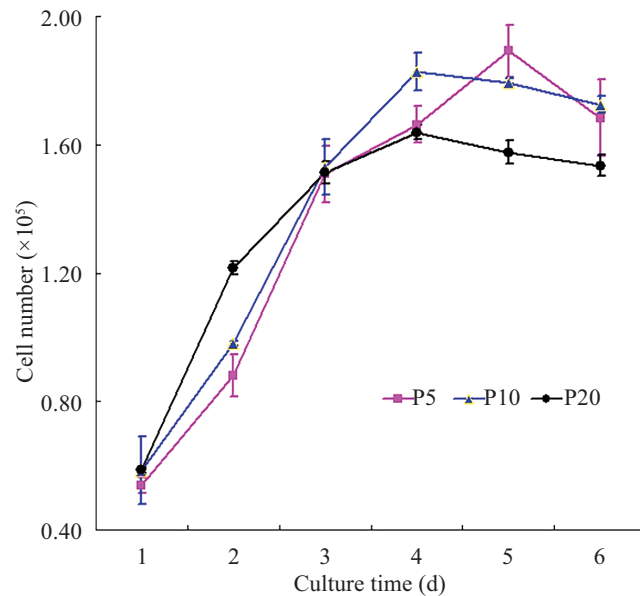


A-C分别代表P5、P10、P20代hUC-MSCs。流式细胞分析结果显示,所有代次的hUC-MSCs的细胞表面免疫标志物呈完全相同的表达模式:CD105、CD90、CD44、和CD73阳性表达,而CD19、CD34、CD45及HLA-DR阴性。

A-C represented P5, P10, P20 generation hUC-MSCs, respectively. Flow cytometry data showed a same expression pattern of the surface markers on hUC-MSCs at all different passages tested: CD105, CD90, CD44, CD73 positive expression, and CD19, CD34, CD45, HLA-DR negative.

图2 不同代次人脐带间充质干细胞的表面标记表达

Fig.2 Characterization of hUC-MSCs surface markers at different passages

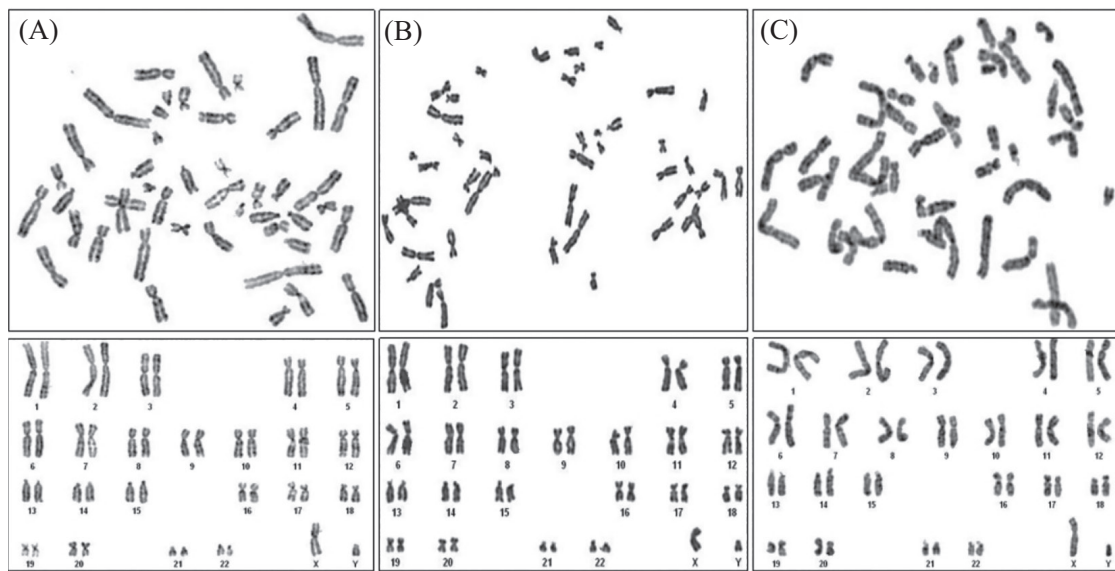


不同代次(第5、10、20代)的hUC-MSCs以同样密度接种于6孔培养板中, 每天分别收集3孔不同代次的hUC-MSCs计数绘制生长曲线。图示代表3次重复实验。

hUC-MSCs at different passages were seeded at same density in 6-well plates. The proliferative curves were made by counting the cells harvested from the hUC-MSCs at different passage every day. Data were representative of three independent experiments.

图3 不同代次人脐带间充质干细胞的增殖活性检测

Fig.3 Proliferation capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells at different passages



A、B、C分别代表P5、P10、P20代hUC-MSCs核型图谱。所有代次(第5、10、20代)hUC-MSCs经常规核型分析呈正常双倍体(46, XY)核型。

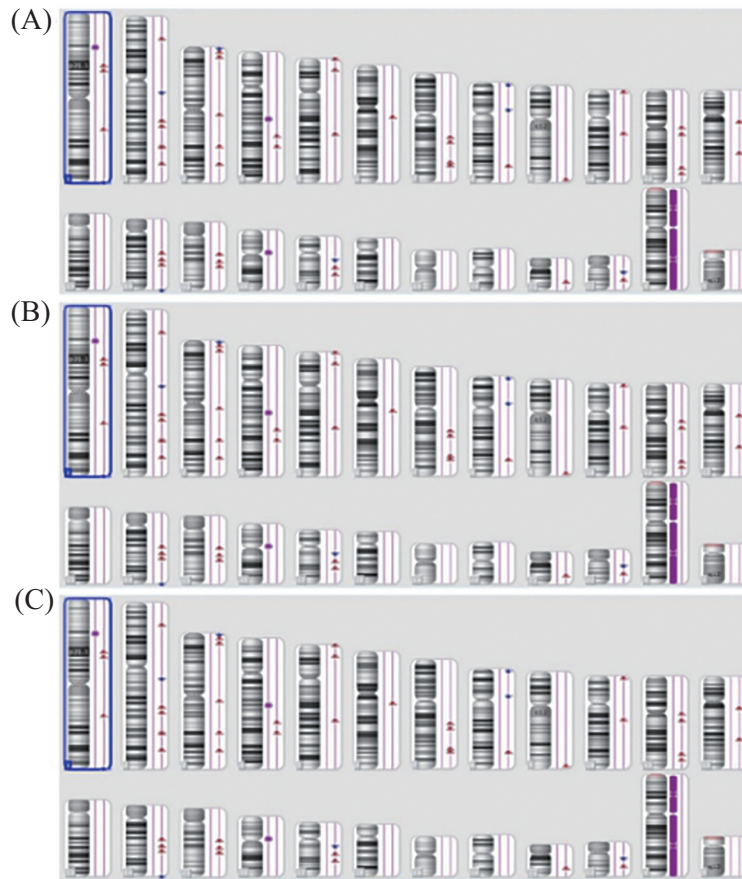
A, B, C represented P5, P10, P20 generation hUC-MSCs, respectively. All hUC-MSCs analyzed at different passages showed a normal karyotype.

图4 不同代次人脐带间充质干细胞常规核型分析

Fig.4 Conventional karyotyping of hUC-MSCs at different passages

基因、癌基因、98% OMIM Morbid基因和100% X染色体OMIM Morbid基因, 包括了最全面、关联性最强的细胞遗传学分析。详细信息可参考[http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/cytoscan\\_hd\\_datasheet.pdf](http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/cytoscan_hd_datasheet.pdf)。依照不同基因片段拷贝

数增多与缺失的程度及其与疾病、癌变基因的关联性确定其是否具有临床意义。染色体微阵列检测结果显示, 第5、10、20代次传代培养的hUC-MSCs染色体全基因组扫描分析未检测到有临床意义的基因拷贝数缺失、重复和大片段纯合子现象(图5)。



A、B、C分别代表P5、P10、P20代hUC-MSCs染色体微阵列分析图谱。采用Affymetrix公司CytoSanHD/CytoSan750K芯片及其配套试剂盒,按优化的操作程序提取不同代次(第5、10、20代)hUC-MSCs的染色体DNA进行染色体全基因组微阵列扫描分析。所有实验质控标准通过的情况下,用Affymetrix Chromosome Analysis Suite Software进行分析,以Affymetrix提供的正常人染色体DNA作为对标准。结果显示,不同代次hUC-MSCs的整套染色体均未检测到与临床致病性相关的的基因拷贝数缺失、重复和大片段纯合子现象(蓝色▲代表重复,红色▼代表缺失,紫色代表纯合子)。

A, B, C represented P5, P10, P20 generation hUC-MSCs, respectively. The CMA of the hUC-MSCs at different passages (P5, P10 and P20) was conducted using the Affymetrix cytoSanHD/CytoSan750K chips with the associated testing kit following the manufacturer's instruction. The data were analyzed with Affymetrix Chromosome Analysis Suite Software, and no significant CNV was found in all different passaged hUC-MSCs (blue ▲: repetition, red ▼: missing, purple: homozygote).

图5 不同代次人脐带间充质干细胞染色体微阵列分析

Fig.5 Chromosomal microarray analysis of hUC-MSCs at different passages

## 2.4 反复体外传代培养hUC-MSCs的多向分化潜能

间充质干细胞的多向分化潜能是其临床应用的关键生物学特征之一。为确定体外反复传代培养对hUC-MSCs多向分化潜能的影响,我们将第5、10、20代hUC-MSCs分别置于特殊的分化诱导培养液中进行成脂与成骨诱导分化培养。经14天成脂诱导和21天成骨诱导后,所有不同代次的hUC-MSCs均可出现成脂和成骨分化(图6A和图6C);所有检测的与细胞分化类型相关的特征性基因均较对照组显著性/非常显著性升高,成脂诱导分化相关基因 $PPAR\gamma$ ( $P<0.05$ )、 $c/EBP-\alpha$ ( $P<0.05$ )、 $Pref-1$ ( $P<0.01$ )(图6B),诱导成骨分化相关基因 $Runx2$ ( $P<0.05$ )、 $OPN$

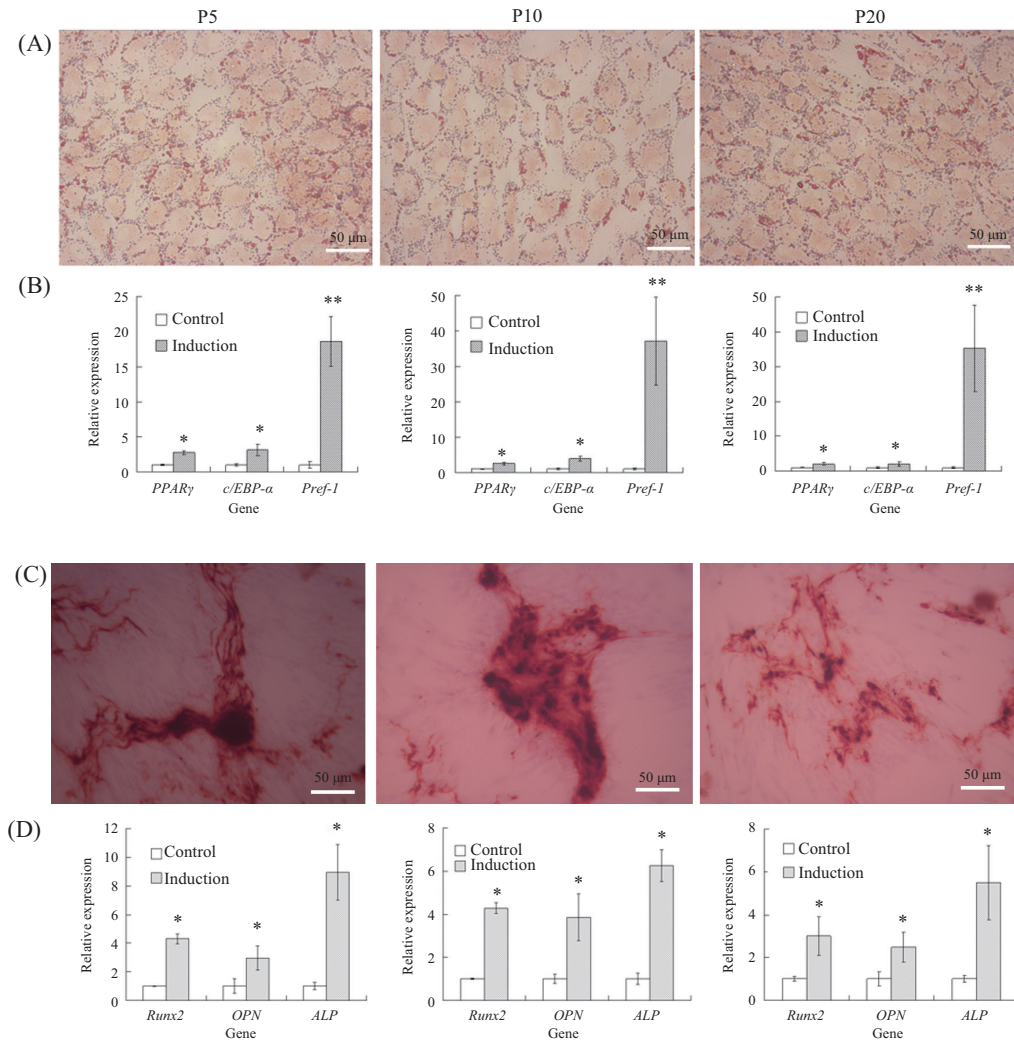
( $P<0.05$ )、 $ALP$ ( $P<0.05$ )(图6D)。这一结果证实,hUC-MSCs经体外传代培养至第20代仍保持良好的多向分化潜能。

## 2.5 反复传代培养的hUC-MSCs端粒酶活性分析

人类端粒酶逆转录酶(hTERT)是人端粒酶的活化亚单位,对端粒酶的活性十分重要。我们采用荧光定量RT-PCR方法检测了第5、10、20代hUC-MSCs中hTERT表达情况。结果表明,hUC-MSCs体外反复传代培养至20代,hTERT的表达水平没有显著性变化(图7)。

## 2.6 hUC-MSCs细胞衰老相关的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色(SA- $\beta$ -gal)检测结果

我们采用 $\beta$ -半乳糖苷酶染色(SA- $\beta$ -gal)法检

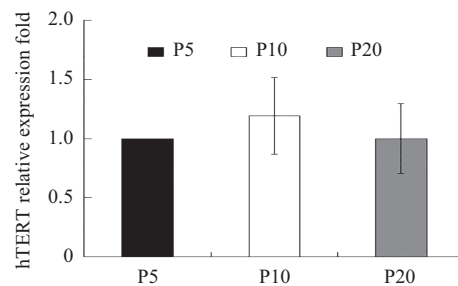


第5、10、20代人脐带间充质干细胞成脂诱导培养14天或成骨诱导培养21天后,分别油红O染色显示胞内脂肪滴(A),茜素红染色显示钙沉着(C)。UC-MSCs成脂、成骨诱导14天,荧光定量PCR显示与成脂细胞(B)、成骨细胞(D)分化相关的基因表达显著升高。 $*P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与对照组相比较。

Human umbilical cord mesenchymal stem cells at passage 5, 10, 20 were induced for osteogenic and adipogenic differentiation visualized by (A) Oil Red O and (C) Alizarin Red staining, respectively. After adipogenic and osteogenic induction by UC-MSCs for 14 days, expression of adipogenic (B) and osteogenic (D) genes were significantly increased by qRT-PCR.  $*P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图6 反复体外传代培养hUC-MSCs的多向分化潜能

Fig.6 Multipotency of hUC-MSCs after long-term *in vitro* culture



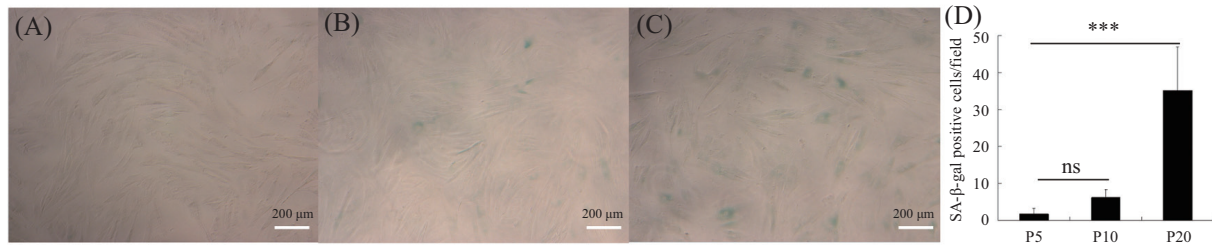
从第5、10、20代人脐带间充质干细胞中提取RNA,以定量RT-PCR检测hTERT表达情况。结果表明,不同代次hUC-MSCs中hTERT的表达无显著性差异( $P > 0.05$ ,  $n = 4$ )。

RNA extracted from hUC-MSCs at passage 5, 10 and 20 was applied for testing the relative expression of hTERT with qRT-PCR. No significant difference was found among the hUC-MSCs from different passages ( $P > 0.05$ ,  $n = 4$ ).

图7 反复传代培养的hUC-MSCs端粒酶活性分析

Fig.7 The relative expression of hTERT in hUC-MSCs at different passages





A-C: 分别代表P5、P10、P20代hUC-MSCs的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色结果,衰老细胞呈蓝色阳性染色;D:随机选取5个不同区域,计数SA-β-gal染色阳性细胞并做统计分析。\*\*\* $P < 0.001$ ; ns:无显著性差异。

A-C: the representative SA-β-gal staining of P5, P10, P20 generation hUC-MSCs; D: the average number of positive cells of hUC-MSCs at different passages counted from 5 randomly selected fields. \*\*\* $P < 0.001$ ; ns: no significance.

图8 不同代次(P5、P10、P20)hUC-MSCs的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色检测

Fig.8 SA-β-gal staining of hUC-MSCs at passage 5, 10, 20

测长期培养后hUC-MSCs的衰老情况。结果表明,hUC-MSCs经过体外长期传代培养后,会逐渐进入衰老期,表现为细胞形态变得扁平,细胞内颗粒物质增多,并且出现SA-β-gal活性,尤以传代晚期的第20代细胞最为显著( $P < 0.001$ ,图8)。该结果说明,体外培养的hUC-MSCs不是永生化的细胞,它会像正常的人体细胞一样,逐渐出现衰老的迹象。

### 3 讨论

我们的研究证实,人脐带间充质干细胞长期体外传代培养后其基本的干细胞生物学属性,如细胞表面免疫标志物和诱导多向分化潜能,无显著性改变。长期培养至20代,未发现致病性或致癌性基因变异。高代次(P20)hUC-MSCs的细胞增殖活性和端粒酶活性亦与早期低代次(P5)细胞无显著性差异。随着培养代次的增加,细胞开始出现老化,尤以20代细胞表现最为明显。

由于传统的骨髓移植技术在临床上的应用已经十分成熟,最初成体间充质干细胞的应用研究多集中在骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)上,随后脂肪间充质干细胞亦引起了人们的重视。虽然这两种成体干细胞仍然是当前干细胞疗法的主要应用细胞,但二者均存在创伤性取材、干细胞分离数量较少、增殖分化能力不足且受供体年龄和健康状况影响较大等明显的缺陷。一般认为,治疗用干细胞的理想来源应具备三个基本特质:易于采集,最大限度降低供者的不适;易于纯化培养,最短时间达到治疗用量;对供体情况限制较少,能为大多数患者(即使用者)所接受。基于这些考虑,hUC-

MSCs作为更为“年轻”的原始成体干细胞正在受到越来越广泛的重视<sup>[2]</sup>。hUC-MSCs的主要优点在于其不表达与免疫排斥反应相关的抗原,免疫原性极低,更为安全;多向分化能力与效率以及许多细胞因子的分泌水平明显高于其他成体干细胞<sup>[2-3]</sup>,因此更适合于临床干细胞疗法的应用。hUC-MSCs的其他优点还包括:易于采集而不会对产妇及新生儿造成任何伤害,无道德伦理障碍;细胞质量不受年龄因素影响;样本来源丰富,干细胞分离产出率高,体外培养增殖活力强,易于大量扩增建立干细胞库并长期存储等。hUC-MSCs的这些优点使其更加适合用于作为干细胞药物进行开发。因此,hUC-MSCs被认为是开创干细胞疗法“新时代”的理想细胞,有望取代骨髓间充质干细胞成为干细胞临床应用新的“金标准”。

体外传代扩增培养以获得足够数量的干细胞是其临床应用的前提条件。我们采用组织块机械分离法分离hUC-MSCs并进行体外长期传代扩增培养,以比较不同代次hUC-MSCs的生物学特性。结果显示,所有代次的hUC-MSCs均呈典型的干细胞贴壁生长和细胞表面标志物表达特征,即CD105、CD90、CD44与CD73高表达(>98%),而不表达或低表达CD19、CD34、CD45及HLA-DR(<2%)。已有研究证实,hUC-MSCs是一种较其他成体干细胞更年轻的间充质干细胞,具有更强、更高效的多向分化潜能,可分化成中胚层的成骨、成软骨和成脂肪细胞,外胚层的神经细胞和神经胶质细胞,以及内胚层的肝脏、胰岛细胞等<sup>[15]</sup>。有研究显示,脐带间充质干细胞扩增培养40代后,依然保持其多向分化潜能<sup>[15]</sup>。我们对不同代次的hUC-MSCs进行成脂和成

骨诱导分化, 发现传代培养至20代后依然保持其正常的成脂肪、成骨细胞分化能力。我们的结果显示, 高代次hUC-MSCs依然保持了干细胞的基本生物学属性, 完全满足国际细胞疗法和间充质与组织干细胞委员会制定的间充质干细胞基础与临床研究的鉴定标准<sup>[14]</sup>。

胚胎干细胞和诱导多能干细胞可能的致瘤风险<sup>[3]</sup>是其临床应用主要的安全性考虑之一。尽管尚无确切的证据表明间充质干细胞具有致瘤性, 相应的安全性考虑依然存在。细胞瘤变的发生与细胞染色体片段的互易、缺失、插入、倒位以及核型的异常改变关系密切<sup>[16]</sup>。我们将hUC-MSCs体外长期传代培养到20代, 未发现任何染色体片段和核型异常。高精度的染色体DNA微阵列分析亦未检测到任何具有临床意义的致病性或致瘤性基因拷贝数改变或大片段纯合子现象。既往的研究亦显示类似结果, 证实长期体外传代培养的脐带间充质干细胞的基因组型依然保持其正常的稳定性<sup>[17-18]</sup>。

以往的研究显示, 虽然高代次培养的hUC-MSCs染色体组型依然保持稳定, 但至第7代时其端粒酶活性会有所下降<sup>[15,19]</sup>。我们通过检测人端粒酶逆转录酶活性亚单位基因的表达显示, 第5、10和20代hUC-MSCs的端粒酶活性之间并没有显著性差异; 且不同代次细胞呈现相似的生长增殖曲线, 表明它们的细胞增殖活力也无差异性<sup>[20]</sup>。但随着细胞培养代次的增加, 细胞中 $\beta$ -半乳糖苷酶活性在第10代hUC-MSCs开始呈现轻微增强, 至第20代时则显著增强。同时, 第20代hUC-MSCs的细胞胞体似有所增大呈扁平状, 局部细胞排列出现紊乱。虽然第20代hUC-MSCs依然保持与低代细胞类似的干细胞生物学属性、基因稳定性和生长特征, 随着传代培养时间的延长, 细胞开始呈现一定程度的老化现象。

综上所述, 我们的研究结果证明, 人脐带间充质干细胞可以在体外长期传代扩增培养而保持其干细胞的基本生物学属性、基因稳定性、增殖活力与多向分化潜能, 是干细胞药物研发理想的种子细胞。鉴于过度的传代培养会导致hUC-MSCs出现老化征象, 我们建议用于干细胞临床治疗的hUC-MSCs体外培养最好不超过第10代。

### 参考文献 (References)

1 Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal

- 2 stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 125.
- 3 Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant* 2015; 24(3): 339-47.
- 4 Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 6901286.
- 5 Todeschi MR, El Backly R, Capelli C, Daga A, Patrone E, Introna M, *et al.* Transplanted umbilical cord mesenchyma stem cells modify the *in vivo* microenvironment enhancing angiogenesis and leading to bone regeneration. *Stem Cells Dev* 2015; 24(13): 1570-81.
- 6 Lamm N, Ben-David U, Golan-Lev T, Storchová Z, Benvenisty N, Kerem B. Genomic instability in human pluripotent stem cells arises from replicative stress and chromosome condensation defects. *Cell Stem Cell* 2016; 18(2): 253-61.
- 7 Kim JS, Park YS, Kim JY, Kim YG, Kim YJ, Lee HK, *et al.* Inhibition of human pancreatic tumor growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model. *Immune Netw* 2012; 12(6): 247-52.
- 8 Pan QZ, Pan K, Wang QJ, Weng DS, Zhao JJ, Zheng HX, *et al.* Annexin A3 as a potential target for immunotherapy of liver cancer stem-like cells. *Stem Cells* 2015; 33(2): 354-66.
- 9 姚惟琦, 武栋成. 一种人脐带间充质干细胞分离培养方法. 中国 (Yao Weiqi, Wu Dongcheng. A method for isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cell. *China*) 201110261543.5[P]. 2016-12-14.
- 10 Li S, Wang Y, Guan L, Ji M. Characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion. *Mol Med Rep* 2015; 12(3): 4320-5.
- 11 张立新, 陈亚宝, 叶军, 李林, 林梅, 黄俊星, 等. 脐带间充质干细胞染色体核型制备及安全评估. 海南医学(Li Xin, Chen Yabo, YeJun, Li Lin, Lin Mei, Huang Junxing, *et al.* Preparation and safety assessment of the chromosome karyotype of umbilical mesenchymal stem cells. *Hainan Medical Journal*) 2012; 23(13): 11-2.
- 12 Bao C, Chen W, Weir MD, Thein-Han W, Xu HH. Effects of electrospun submicron fibers in calcium phosphate cement scaffold on mechanical properties and osteogenic differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta Biomater* 2011; 7(11): 4037-44.
- 13 Bièche I, Noguès C, Paradis V, Olivi M, Bedossa P, Lidereau R, *et al.* Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 452-9.
- 14 Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20): 9363-7.
- 15 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 16 Grade M, Difilippantonio MJ, Camps J. Patterns of chromosomal aberrations in solid tumors. *Recent Results Cancer Res* 2015; 200: 115-42.
- 17 Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2013; 14(6):

- 11692-712.
- 17 Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, *et al.* Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis* 2013; 4: e950.
- 18 De Witte SFH, Lambert EE, Merino A, Strini T, Douben HJCW, O'Flynn L, *et al.* Aging of bone marrow-and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy* 2017; 19(7): 798-807.
- 19 王有为. 脐带间充质干细胞临床前安全性研究(博士论文). 北京协和医学院(Wang Youwei. Doctoral dissertation of preclinical safety study of umbilical cord mesenchymal stem cells. Peking Union Medical College), 2013.
- 20 Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, *et al.* Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT, the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 1998; 16(9): 1217-22.