

## 人脐带间充质干细胞过敏性试验<sup>\*</sup>

许键炜<sup>1</sup>, 何志旭<sup>1,2\*\*</sup>, 舒莉萍<sup>1,3,4</sup>, 王凤昌<sup>2\*\*\*</sup>

(1. 贵阳医学院 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 儿科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵阳医学院 实验动物中心, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 观察人脐带间充质干细胞对豚鼠的过敏性反应, 为临床使用人脐带间充质干细胞的安全性提供参考。方法: 培养扩增人脐带来源的间充质干细胞, 制备成细胞生理盐水混悬液。将 30 只豚鼠分成 3 组, 分别是模型 1 组、模型 2 组和对照组。2 个模型组隔日肌注细胞生理盐水混悬液 3 次, 实验 1 组于首次注射后第 14 天, 实验 2 组于首次注射后第 21 天分别静脉注射混悬液进行攻击。观察动物有无过敏反应症状。结果: 动物无明显过敏反应症状, 反应级数为 0 级。结论: 人脐带间充质干细胞免疫原性低, 不易导致过敏反应。

**[关键词]** 豚鼠; 干细胞; 过敏反应; 细胞培养; 人脐带间充质干细胞

**[中图分类号]** R392.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)01-0005-03

## Allergy Test of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

XU Jianwei<sup>1</sup>, HE Zhixu<sup>1,2</sup>, SHU Liping<sup>1,3,4</sup>, WANG Fengchang<sup>2</sup>

(1. Stem Cell and Tissue Engineering Research Center, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. Department of Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. The Center of Animal Laboratory, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe allergic reactions of guinea pigs caused by human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs), and so as to provide reference for the security of clinical use of HUCMSCs. **Methods:** HUCMSCs were cultured and amplified, and prepared into cell and normal saline suspension. Thirty guinea pigs were divided into 3 groups: the first model group, the second model group and control group. Guinea pigs in the two model groups were injected with the suspension every other day for three times, in the 14<sup>th</sup> days and the 21<sup>th</sup> days after the first injection, guinea pigs in the first and second model groups were intravenously injected with the suspension again respectively. whether allergic reaction occurred were observed. **Results:** The animals had no obvious allergic symptoms, the reaction order was 0. **Conclusions:** HUCMSCs have low immunogenicity and are uneasy to cause allergic reactions.

**[Key words]** guinea pigs; stem cells; anaphylaxis; cell culture; human umbilical cord mesenchymal stem cells

干细胞技术作为转化医学的核心,已成为近年来生命科学领域研究的热点。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是干细胞家族的重要成

员,来源于发育早期的中胚层和外胚层。MSCs 最初在骨髓中发现,随后研究发现其还存在于人体发生、发育过程的多种组织中。目前,能够从骨髓、脂

<sup>\*</sup>[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30560159);贵州省“125 计划”重大科技专项(黔教合重大专项字[2013]020);贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字[2012]036 号)

<sup>\*\*</sup>通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn

<sup>\*\*\*</sup>贵阳医学院 2011 级硕士研究生

网络出版时间:2014-02-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140226.1352.037.html>

肪、滑膜、肌肉、肺、肝、胰腺等组织以及羊水、脐带及脐带血中分离和制备间充质干细胞<sup>[1]</sup>。MSCs具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点,因而日益受到人们的关注<sup>[2]</sup>。MSCs在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能,可作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。脐带来源的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)具有取材方便,无伦理学争议、增殖能力强等优点。近年来,研究报道 HUCMSCs 已应用于多种传统方法难以取得满意疗效的疑难病症的治疗中,显示出了良好的疗效,在新兴的转化医学中展现出广阔的应用前景,但作为种子细胞的间充质干细胞的安全性也同时必须考虑<sup>[3]</sup>。豚鼠作为过敏反应的理想动物,广泛用于疾病模型和药物实验研究。本实验旨在通过 HUCMSCs 对豚鼠的过敏性试验,为临床使用 HUCMSCs 的安全性提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新生儿脐带(贵阳市黔灵人民医院产科提供); L-DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、无血清培养基(美国 Gibco 公司)、0.25% 胰蛋白酶及 10% 胎牛血清(FBS, 美国 Hyclone 公司); 倒置相差显微镜(日本 PANASONIC 公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Forma 公司)、流式细胞仪(MOFLO High Performance Cell Sorter, 美国 BECKMAN COULTER 公司); 豚鼠由第三军医大学大坪医院动物中心提供,合格证号:SCXK(渝)2007-0005。

### 1.2 方法

**1.2.1 HUCMSCs 的分离、纯化、增殖培养、鉴定** 取符合要求的新生儿脐带(产妇年龄在 20~35 岁,身体健康,无各种急、慢性疾病。胎儿足月,健康,无畸形,体质量超过 2 500 g。采集新生儿脐带约 10 cm,去除脐带外膜层和脐带内动静脉,保留华尔通胶,机械法消化,剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm,平铺接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶,10% FBS 加 L-DMEM 液,37℃,饱和湿度下,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,倒置相差显微镜逐日观察,3~5 d 后半量换液,以后每 3 d 用含 10% FBS 的 L-DMEM 全量换液,待细胞融合至 50% 后去除组织块,继续培养。待细胞融合

至 80%~90% 后传代,传至第 1 代后加用含有生长因子的无血清培养基培养。传至第 4 代,应用流式细胞仪进行细胞膜表面分子 CD90、CD44、CD105、CD73 的水平检测分析,并设立阴性对照。

**1.2.2 实验分组、细胞注射及指标观察** 取健康、无伤,2 月龄,体重约 300 g 豚鼠 30 只,雌雄各半。专用饲料,分笼饲养。实验前适应性饲养 1 周,随机数字表法将其分为 3 组,每组 10 只,雌雄各半。第一组为模型 1 组,第二组为模型 2 组,第三组为对照组。按无菌操作,第一组和第二组隔日每只肌肉注射供试品(含 HUCMSCs  $1.0 \times 10^5$  的生理盐水混悬液 0.5 mL),共 3 次。之后,第一组于首次注射后的第 14 天,由静脉注射含 HUCMSCs  $1.0 \times 10^5$  的生理盐水混悬液 0.5 mL 进行攻击,第二组于首次注射后的第 21 天同法进行攻击。第三组在相同时间点,同样方法注射等量生理盐水,观察以上两组模型组豚鼠在注射细胞混悬液后有无抓鼻、竖毛、呼吸困难、痉挛、休克甚至死亡等过敏反应症状,并作过敏反应评级。反应症状与级数:无明显反应为 0 级;只有轻微抓鼻、颤抖或竖毛为 1 级;有几次咳嗽,有抓鼻、颤抖或竖毛为 2 级;多次或连续咳嗽,伴有呼吸困难或痉挛、抽搐等为 3 级;痉挛、抽搐、大小便失禁、休克、死亡为 4 级。反应级数达 2 级以上(包括 2 级)时,则认为该供试品过敏试验不合格。如果各组豚鼠均无明显反应,可认为供试品 HUCMSCs 过敏试验合格<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 HUCMSCs 的分离、培养、鉴定及收集

**2.1.1 细胞培养结果** 接种约 1 周时间可见细胞从组织块中长出,贴壁生长,见图 1。接种 14 d,细胞融合至 50%。去除组织块后,细胞生长迅速,呈梭形或多角形、旋涡状或流水样分布。培养 20 d,细胞融合达 80%~90%。传至第 1 代加用含有生长因子的无血清培养基培养后,生长更加迅速。1 传 2,3~5 d 融合至 80%~90%,可传下一代。见图 2。

**2.1.2 流式细胞鉴定结果及细胞收集** 流式细胞仪检测结果显示,培养至第 4 代以后,细胞形态无明显变化,无衰老征象。流式细胞仪检测结果显示 CD90<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>,而 NOT-HUCMSCs 阴性,符合 MSCs 的生物学特征<sup>[5-6]</sup>。使用前用胰酶消化后离心,生理盐水洗涤 2 遍重悬成细胞

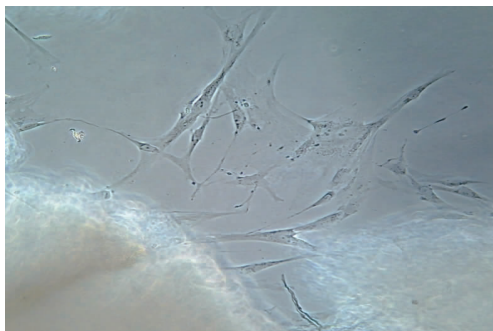


图1 培养第10天的原代人脐带间充质干细胞(100×)

Fig.1 Primary HUCMSCs cultured for 10 days

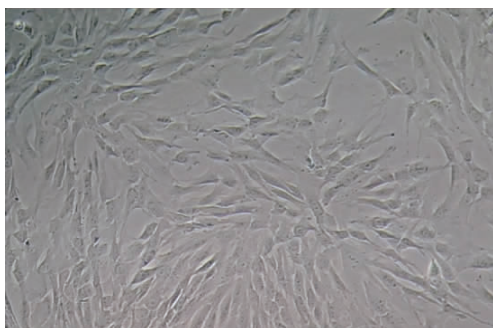


图2 培养第20天的原代人脐带间充质干细胞(100×)

Fig.2 Primary HUCMSCs cultured for 20 days

悬液备用。台盼蓝染色计数,活细胞数达90%以上。

## 2.2 豚鼠过敏试验结果

各组未见豚鼠抓鼻、颤抖、竖毛、咳嗽、呼吸困难或痉挛、抽搐以及大小便失禁、休克、死亡等过敏反应症状,反应级数为0级。模型组和对照组豚鼠均未见明显差异。

## 3 讨论

MSCs独特的生物学特征和良好的应用前景,在组织工程领域俨然成为了研究的热点。特别是其跨系统、跨胚层的分化潜能,对诸如免疫、遗传、内分泌、心血管、消化、神经、骨与关节等系统疾病的治疗以及损伤的修复、器官的重建有着深远的影响,对细胞生物学的发展也具有重大的意义。但由于目前尚缺乏MSCs的特异性标志,对MSCs的特

征描述及其分离方法都是以细胞群体的形式进行。研究显示, MSCs能表达CD73、CD90、CD105、CD44及HLA-ABC等,不表达CD34、CD45、CD31等造血干细胞标志<sup>[7]</sup>。并表达原始干细胞标志,如白血病抑制因子受体通路、胚胎干细胞特异性基因I、端粒逆转录酶、Nanog、STAT3、AP、Oct4、HLA-I等<sup>[8]</sup>。MSCs在体外的混合淋巴细胞反应体系中不诱发同种异体外周血单个核细胞的增殖,使T细胞的增殖几乎被完全抑制,提示MSCs具有较为独特的免疫原性和免疫调节性。研究发现,自体或异体的MSCs加入到有丝分裂原刺激的外周血淋巴细胞培养体系中,均能明显抑制T淋巴细胞的增殖活化<sup>[9-10]</sup>。此外,有学者发现即使MSCs分化成其他类型的细胞,也继续保留它的免疫调节作用,并能避免移植物抗宿主病的发生<sup>[11]</sup>。HUCMSCs作为一类免疫缺陷细胞,不需经过严格配型即可使用,异体移植无免疫排斥反应或反应较弱,适宜于不同个体之间的移植<sup>[12]</sup>。

本试验通过机械法分离、培养、扩增可获得大量HUCMSCs,通过其对豚鼠的过敏性研究,结果初步表明HUCMSCs免疫原性低,不会发生免疫排斥反应,其应用于临床是安全可行的。HUCMSCs来源丰富,采集方便,容易获得,对产妇和新生儿不会带来任何创伤和不良反应,且该细胞更原始,增殖能力强,长期传代不易分化,不会产生肿瘤细胞,其病毒和其他病原微生物感染及传播几率也相对较低,亦不涉及社会、伦理和法律方面的争议,是组织工程理想的种子细胞,有望取代骨髓间充质干细胞成为组织工程更好的研究对象。随着对HUCMSCs生物学特性研究的不断深入,相信其必将广泛应用于临床诸多疾病的治疗和抗衰老以及亚健康领域,为人类健康和生活质量的提高发挥巨大作用。

## 4 参考文献

- [1] 李忠俊,相丽欣,叶兴德. 间充质干细胞研究进展[J]. 中国输血杂志, 2013(4):307-309.
- [2] Kalwitz G, Endres M, Neumann K, et al. Gene expression profile of adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated by the chemokine CXCL7 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009(3): 649-658.
- [3] 王艳,张晋林,黄晓兵,等. 脐带间充质干细胞研究现状与临床治疗[J]. 重庆医学, 2013(18):2161-2163.
- [4] 魏伟. 药理学实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:160-161. (下转第17页)