

间充质干细胞冻干粉制备条件优化

杨前刁波* 张宜王刚 陈力袁紫林 王立平

中国人民解放军武汉总医院医学实验科 430070 深圳市新一仑生物科技有限公司 518000

【摘要】目的 优化脐带间充质干细胞冻干粉的制备条件。**方法** 培养脐带间充质干细胞；流式细胞仪检测干细胞特征；使用封口膜将西林瓶中上清液封口扎孔，放置冷冻干燥机中制备成冻干粉，对比效果。**结果** 使用封口膜封口后冻干粉产量提升很多，损耗减少，有利于后续实验。**结论** 通过使用封口膜封口扎孔后在冷冻干燥处理，降低了真空冷冻干燥引起的损耗，能得到较好质量和形态的干细胞冻干粉。

【关键词】 干细胞；冻干粉；封口膜

【中图分类号】 R329

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-0415 (2018) 10-247-02

脐带间充质干细胞 (huc-MSCs) 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞，其来源丰富、易于取材。有文献报道^[1]，脐带间充质干细胞能分泌大量细胞活性因子，包括血管内皮生长因子、表皮生长因子、血管生成素和干细胞因子等，具有对氧化应激、修复创伤、调节皮肤色素代谢，维持内环境稳定等作用^[2]；但同时细胞因子的生物活性存在时效性，随着保存时间延长，活性会逐渐减退消失，影响细胞因子功能；鉴于此，本课题组利用冷冻干燥技术，将MSC细胞活性因子做成冻干粉剂，-20℃能长期保存，最大程度上保护了细胞因子的生物活性，在实验过程中，不断摸索优化冻干条件，为后期科研提供理论基础和依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器及试剂

间充质干细胞无酚红培养基、胰蛋白酶(天津灏洋生物科技)；CD31、CD73、HLA-DR-Per-CP、CD29 抗体 (BD)；低速离心机 (赫西, TDL 5M)、高速冷冻离心机 (SIGMA, 3K15)；生物安全柜 (苏净安泰)；CO2 培养箱 (Thermo, 311)；倒置显微镜 (奥林巴斯)；冷冻干燥机 (宁波新芝)。

1.2 脐带间充质干细胞培养及鉴定

取增殖活性强的P3代MSCs进行扩增，待细胞汇合率达到90%左右时，消化，50μl PBS混悬，然后分别加入10μl CD31，10μl CD73，10μl DRPer-CP，5μl CD29，避光孵育15min，用PBS清洗一遍，1000转/分，离心5分钟，沉淀用500μl PBS重悬后，上流式细胞仪检测分析。

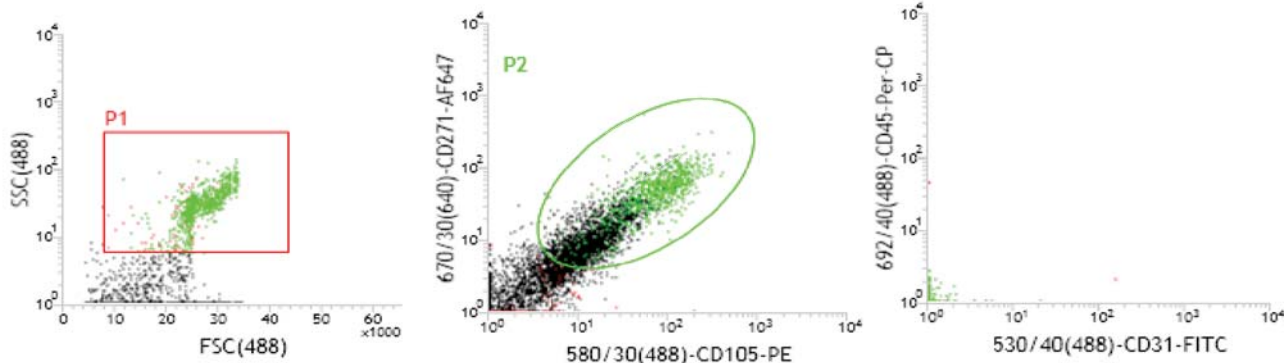
1.3 huc-MSCs 细胞活性因子冻干粉制备

将细胞状态良好、增殖能力强的P4代MSCs上清液分两批装入无菌西林瓶中，2ml/瓶，每批各50只，其中一批用封口膜全部封口后，在使用注射器在每个瓶口上扎若干小孔，保证透气，另一批则不封口，迅速放置-80℃低温冰箱中凝固成固体，然后冷冻干燥，真空升华至少24小时，待样品完全冻干至粉末状，放置-80℃低温冰箱中长期保存；观察记录不同冻干条件下冻干粉制备效果。

2 结果

2.1 huc-MSCs 流式检测

经过流式检测得到P3代的人脐带间充质干细胞呈现CD73(+)、CD29(+)、CD31(-)、HLA-DR-Per-CP(-)纯度和活性都比较高的间充质干细胞特点，见(图1)。



| Populations: 201801010 | | | |
|------------------------|--------|---------|----------|
| Populations | Events | % Total | % Parent |
| All Events | 10,000 | 100.00% | ### |
| P1 | 898 | 8.98% | 8.98% |
| P2 | 816 | 8.16% | 90.87% |

huc-MSCs流式细胞检测图

2.2 冻干粉不同制备条件图：(图2)

间充质干细胞上清液经过冷冻干燥机将近24h冻存后，包扎有封口膜的西林瓶，冻干效果非常好，产品呈现乳白色奶片状，而没有包扎封口膜的西林瓶在抽真空冻干过程中，损耗很大，冻干效果不是很理想。

3 讨论

近年来，有关间充质干细胞在美容抗衰方面的报道愈来愈多，人体的皮肤老化是一个复杂的生物学过程，如TGF-1β信号传导通路

与人体胶原蛋白合成有密切关联^[2]，而研究表明干细胞分泌系列活性因子能够激活真皮层，调节细胞分化，具有抗衰老和美容护肤的功效^[3]。同时研究发现使用冷冻干燥技术，可长时间保存细胞因子且活性稳定性可靠^[4]。但是不同的制备条件冻干效果相差巨大，实验过程中就发现，少批量冻干情况下，不使用封口膜液体固态升华过程中，很容易溶解蒸发，造成产品损耗，产量大大下降，而使用封口膜冷冻干燥以后，损耗降低很多，冻干粉剂制备很成功，为后续实验提供理论基础和科研数据。

* 通讯作者：刁波

(下转第250页)

使其在严格掌握各类药品的适应证、禁忌证、不良反应等基础知识的水平上,着重掌握纳入医保范围的药品种类,以便能够在开药时避免由于医保因素而引起的退药。不仅如此,医生在开药时要详细地询问患者的疾病史、过敏史、肝肾功能、自备药情况,避免造成不合理用药或重复开药的情况。同时,处方医生要加强与门诊西药房工作人员之间的沟通,及时做到信息互通,不断提高服务质量。③加强药房管理,保证药品质量:首先药房要建立真实、完善的药品购进验收记录,并妥善保管,每月定期清查药品库存,及时发现短缺药品,及时进行补充。其次对于邻近有效期的药品,要进行良好的说明和公示,确保患者能够在药品有效期1个月前用完。最后加强对药房药品的检查和管理,一旦发现短缺药品,则要立即将其在药品库存电子信息系统中标注或直接屏蔽,避免由此造成退药^[5]。④设置用药咨询窗口,确保用药安全:门诊西药房可设置专门的用药咨询窗口,便于患者进行用药方面的咨询,使其更好地掌握药品基本知识、使用方法、注意事项,保证患者的用药安全。

综上所述,退药普遍存在与门诊西药房中,只有深入分析引起退药的原因,并制定具有针对性的应对措施,才能够从根本上规避引起退药的原因,从而显著降低门诊西药房退药率,为患者提供更加优质的医药服务。

参考文献

[1] 张红梅. 门诊药房退药原因分析及处理对策探讨[J]. 河南医学研究, 2014, 13(09): 160-161.
 [2] 罗利琼, 李慧超, 陈健达, 等. 门诊西药房退药原因及应对措施分析[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(04): 15.
 [3] 岑海涛. 门诊西药房患者退药的常见原因及应对措施分析[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(16): 186-187.
 [4] 孟小兰, 唐彩娥. 某院门诊西药房退药的原因分析及管理对策[J]. 中国医药指南, 2015, 8(15): 295-296.
 [5] 朱文嫣. 西药房退药情况的分析及报告[J]. 中国社区医师, 2016, 32(30): 16-18.

(上接第245页)

依从性,降低并发症发生率。本次研究中,观察组患者的导管维护依从性高于对照组(P<0.05),同时治疗过程中,观察组患者的并发症发生率3.3%低于对照组的15.0%(P<0.05),说明给予PICC置管高龄患者强化护理干预能够提高患者依从性,显著降低输液风险,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 雷音梅, 王晓楠, 潘艳等. PICC置管患者导管维护依从性现状调查及护理干预[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2017,

2(18):163, 167.

[2] 仇甜, 张正艳, 李萍. PICC规范化培训与管理对降低置管后并发症的效果观察[J]. 健康周刊, 2017(28):40-41.
 [3] 朱霞, 沈琴. 护理干预对PICC置管患者导管维护依从性及并发症的影响[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2017, 2(9):169-170.
 [4] 蒋晓荣. 浅谈护理干预对基层医院PICC置管患者导管维护依从性及并发症的影响[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2017, 2(39):134.
 [5] 王金燕. 1例高龄患者PICC导管留置49个月的护理体会[J]. 中外医学研究, 2017, 15(14):97-99.

(上接第246页)

骨科患者术后卧床,受到疼痛、固定等因素的影响,肌力下降,虽康复训练有利于促进患者功能恢复,但由于康复训练时间漫长,且是一个持续性不间断的过程,所以患者较易产生厌倦心理、缺乏信心及主观能动性,通过在舒适护理当中引入激励法,能够激发患者为目标而奋斗的欲望,调动起积极性、进取心,达到事半功倍的效果^[5]。

从表1可见,研究组患者功能、配合度皆要明显好于常规组。这也证实,采用有效的舒适护理方法,能够对创伤骨科患者术后康复训练产生积极影响,提高其功能、配合度。

参考文献

[1] 田凤英. 舒适护理对创伤骨科患者术后康复训练的影响探讨[J]. 临床研究, 2016, 24(12):156-157.

[1] 田凤英. 舒适护理对创伤骨科患者术后康复训练的影响探讨[J]. 临床研究, 2016, 24(12):156-157.
 [2] 蒲小兰. 疼痛控制护理对创伤性骨折患者术后康复的干预价值[J]. 中国医药指南, 2015, 13(29):2, 4.
 [3] 宋子春. 骨科创伤疼痛护理管理模式在胫骨远端骨折的应用研究[J]. 当代护士(下旬刊), 2016, 34(11):51-52, 53.
 [4] 熊瑶. 中医疼痛控制护理模式在创伤性骨折患者术后康复中的应用[J]. 护理实践与研究, 2018, 15(11):138-140.
 [5] 石丽梅. 疼痛控制护理对创伤性骨折患者术后康复的临床价值[J]. 中国医药指南, 2016, 14(26):222-223.

(上接第247页)



图2. a: 冻干未使用封口膜; b: 冻干过程使用封口膜

参考文献

[1] 卓华丽, 白利鹏, 刘丹等. 视黄醇对人脐带间充质干细胞表皮

生长因子视黄醇对人脐带间充质干细胞表皮生长因子、干细胞因子、集落刺激因子1和白和白白血病抑制因子的影响[J]. J South Med Univ, 2017, 37(2): 221-225.

[2] 闵倩, 陈雪梅, 苗瀛, 吴滢梵, 徐荻. 间充质干细胞和淋巴细胞分泌细胞因子的抗衰老功效研究[J]. 中国医疗美容, 2018, 8(7):85-90.
 [3] Li M, Zhao Y, Hao H, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-conditioned medium exerts in vitro antiaging effects in human fibroblasts[J]. Cytotherapy, 2017, 19:371-383.
 [4] 李洪超, 金银鹏, 王哲, 李莉, 傅青春. 人脂肪干细胞及外泌体冻干粉的安全性[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(29):4593-4600.

(上接第248页)

[1] 苏永, 吕建平. 血站输血检验的质量控制及安全性探讨[J]. 中国卫生标准管理, 2017, 8(27):143-144.
 [2] 程路玲, 汪邦山, 卫明珠, & 林正明. (2017). 输血检验流程的质量控制对输血安全改进的探究[J]. 中国卫生产业, 14(33), 45-46.
 [3] 梅礼军, 陈葳. 输血患者不良反应的临床特点及其相关影响因素分析[J]. 国外医学医学地理分册, 2017, 38(1):45-47.

[4] 李胜彦, 徐李红. 影响临床输血安全的因素与对策分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(43):8346-8346.
 [5] 黎明新, 朱明艳, 万冰, 王睿 & 马佳. (2017). 不同方法筛查血液透析人群中丙型肝炎病毒感染结果的比较分析[J]. 沈阳医学院学报, 19(6), 469-472.
 [6] Huang X S, Phillips L, Lefebvre P. MEDIUM USED FOR BLOOD SAMPLE COLLECTION AND TRANSPORT, EP3132246[P]. 2017.