

间充质干细胞冻干粉不同制备条件研究

杨前¹ 张宜^{1,2} 王刚^{1,2} 陈力^{1,2} 袁紫林^{1,2} 刘莹² 刁波^{1,2*}

1 中国人民解放军武汉总医院医学实验科 湖北武汉 430070

2 湖北省中枢神经系统肿瘤与干预重点实验室 湖北武汉 430070 深圳市新一仑生物科技有限公司

【摘要】目的 研究摸索不同脐带间充质干细胞冻干粉制备条件。**方法** 培养脐带间充质干细胞；用不同型号的西林瓶分装不同体积干细胞上清液，低温冻存后，放置冷冻干燥机中制备冻干粉；**结果** 不同容积西林瓶盛装的液体不同，冷冻干燥时间也不同，3ml 西林瓶盛装 1ml 液体只需 12H 以内即可制备成功，装 2ml 液体则需要 12-24H，装 3ml 液体则需要 24-48H；同时冻干时数量越多冷冻干燥时间越久；**结论** 使用 SCIENTZ-12N 冷冻干燥机针对不同容积不同数量的样品，所需时间均不相同，明确知道每一种特定容量的样品冻存时间段，最大程度的提高冻干效率。

【关键词】 间充质干细胞；冻干粉；西林瓶

【中图分类号】 Q813

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4596 (2018) 12-006-02

Study on preparation conditions of different mesenchymal stem cells lyophilized powder

【Abstract】 Objective To study the preparation conditions of different umbilical cord mesenchymal stem cells lyophilized powder. **Methods** Umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMSCs) were cultured, and the supernatants of different volumes of stem cells were packed in different types of西林 bottles. After cryopreservation, freeze-dried powder was prepared in a freeze-dryer. **Results** Different volumes of cillin bottles contained different liquids, and the freeze-drying time was different. 3 ml of cillin bottles contained 1 ml of liquid only needed 12 h to prepare, 2 ml of liquid needed 12-24H, 3 ml of liquid needed 24-48H; at the same time, the more the amount of freeze-drying time, the longer the freeze-drying time. **Conclusion** Using SCIENTZ-12N freeze-dryer for different volumes and different quantities of samples, the required time is different. It is clear that the freeze-drying period of each specific volume sample can be known to maximize the freeze-drying efficiency.

【Key words】 MSC; lyophilized powder; Xilin bottle

间充质干细胞 (MSC) 是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞，主要存在于骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织和器官间质中^[1]，而脐带间充质干细胞因其来源丰富、易于取材收集成为了临床应用研究的热点^[2]。有文献报道，脐带间充质干细胞能够分泌多种细胞因子和生长因子，包括血管内皮生长因子、表皮生长因子、血管生成素和白细胞介素等，有消炎、调节免疫及对抗皮肤光老化，对维持机体的内环境起着重要的作用^[3]。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，同时设置不同的冻干条件观察摸索最佳冻干效果，为后期科研提供理论基础和依据。

1 材料与与方法

1.1 仪器及试剂

间充质干细胞无酚红培养基、0.1% 胰蛋白酶 / 柠檬酸 (天津灏洋生物)；CD31-FITC、CD73-PE、HLA-DR-Per-CP、CD29-APC 抗体 (美国 BD)；精宏水浴锅 (XMTD-8222)；

低速离心机 (飞鸽 TDL-80-2B)、高速冷冻离心机 (SIGMA3K15)；生物安全柜 (苏净安泰生物)；CO2 培养箱 (Thermo Fihsher)；倒置显微镜 (Olympus)；冷冻干燥机 (SCIENTZ-12N)。

1.2 脐带间充质干细胞培养及鉴定

取增殖活性强的 P3 ~ P4 代 huc-MSCs 进行扩增，待细胞汇合率达到 90% 左右时，用 0.1% 胰蛋白酶 / 柠檬酸将其消化，用 50 μ l PBS 混悬，然后分别加入 10 μ l CD31-FITC，10 μ l CD73-PE，10 μ l DRPer CP，5 μ l CD29-APC，避光孵育 15min，用 PBS 清洗一遍，后 1000rpm/min，离心 5min，沉淀用 500 μ l 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 P3 ~ P6 代 huc-MSCs 上清液收集至 3ml 无菌西林瓶中，分别装入体积为 1ml、2ml、3ml 量的上清液各 50 只，迅速放置 -80℃ 低温冰箱中凝固成固体，然后在放置预设置好参数的冷冻干燥机中，除去冰晶，升华干燥 8-48 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；观察记录不同体积分量的上清液冻干所需时间。

2 结果

2.1 huc-MSCs 流式检测结果

经过流式检测得到 P3 代次的脐带间充质干细胞呈现 CD29 (+)、CD73 (+)、CD31 (-)、HLA-DR-Per-CP (-) 纯度和活性都比较高特点；见 (图 1)。

2.2 冻干粉制备样品曲线，见 (图 2)

在本次实验中，同等数量的 3 ml 西林瓶内装的 1 ml huc-MSCs 上清液经过将近 9H 冷冻干燥后成白色粉末状冻干粉，2ml 上清液则需将近 24H，3ml 上清液需将近 38H 制备成成品，成品均质地均匀，颜色纯白，并且加入溶媒后，很快溶解，基本符合冻干粉的制备要求，样品制备成功。

3 讨论

近年来，有关间充质干细胞临床应用研究特别多，其中不乏皮肤疾病方面的报道^[3]有研究报道干细胞具有美容抗衰老的功效，干细胞具有较高的端粒酶活性，是人体的青春活力因子；中国整形美容协会更是出台《干细胞抗衰老技术规范指南》对干细胞美容抗衰老工作提出一系列的要求和规范，促进干细胞美容医疗临床研究和应用的发展^[4]。而针对生物活性因子体外容易失活这一特性，有学者发现使用冷冻干燥技术，则可长时间保存且因子活性稳定性可靠^[5]。并且经过这些细胞活性因子经冷冻干燥之后，均不宜发生溶血实验，免疫原性低、安全稳定^[6]。但是不同体积的溶液需要的预冻条件也不相同，冻干过程中需要根据容器体积量设置冻干条件，以求达到最佳冻存效果，最大程度保护细胞因子活性不受损。

第一作者：杨前，女，硕士，武汉总医院医学实验中心，技师，主要从事干细胞的基础与临床应用研究。

* 通讯作者：刁波，男，博士，硕士生导师，武汉总医院医学实验中心，副主任。

参考文献

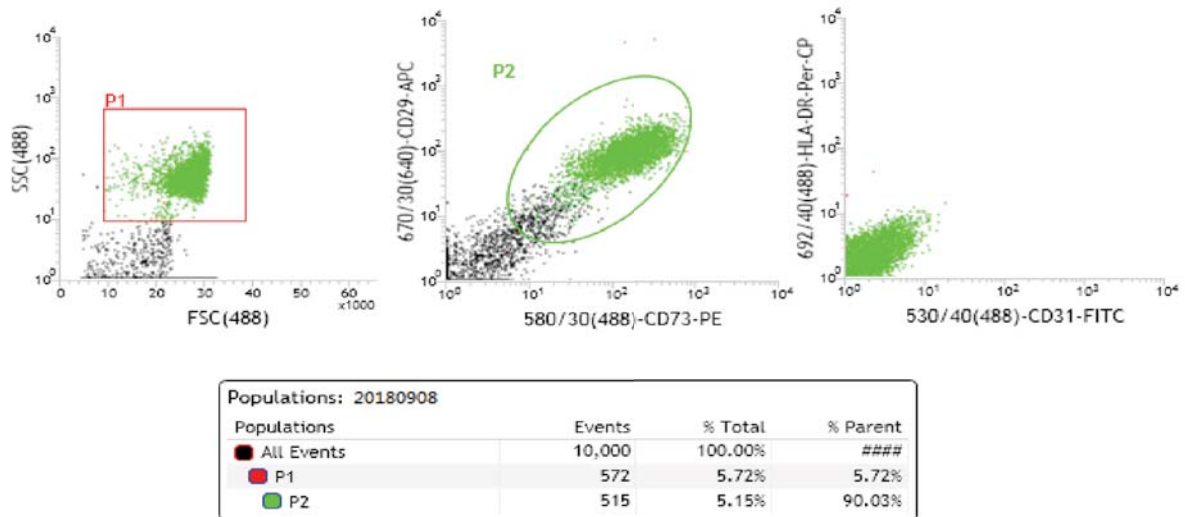


图1、huc-MSCs 表面标志物流式检测

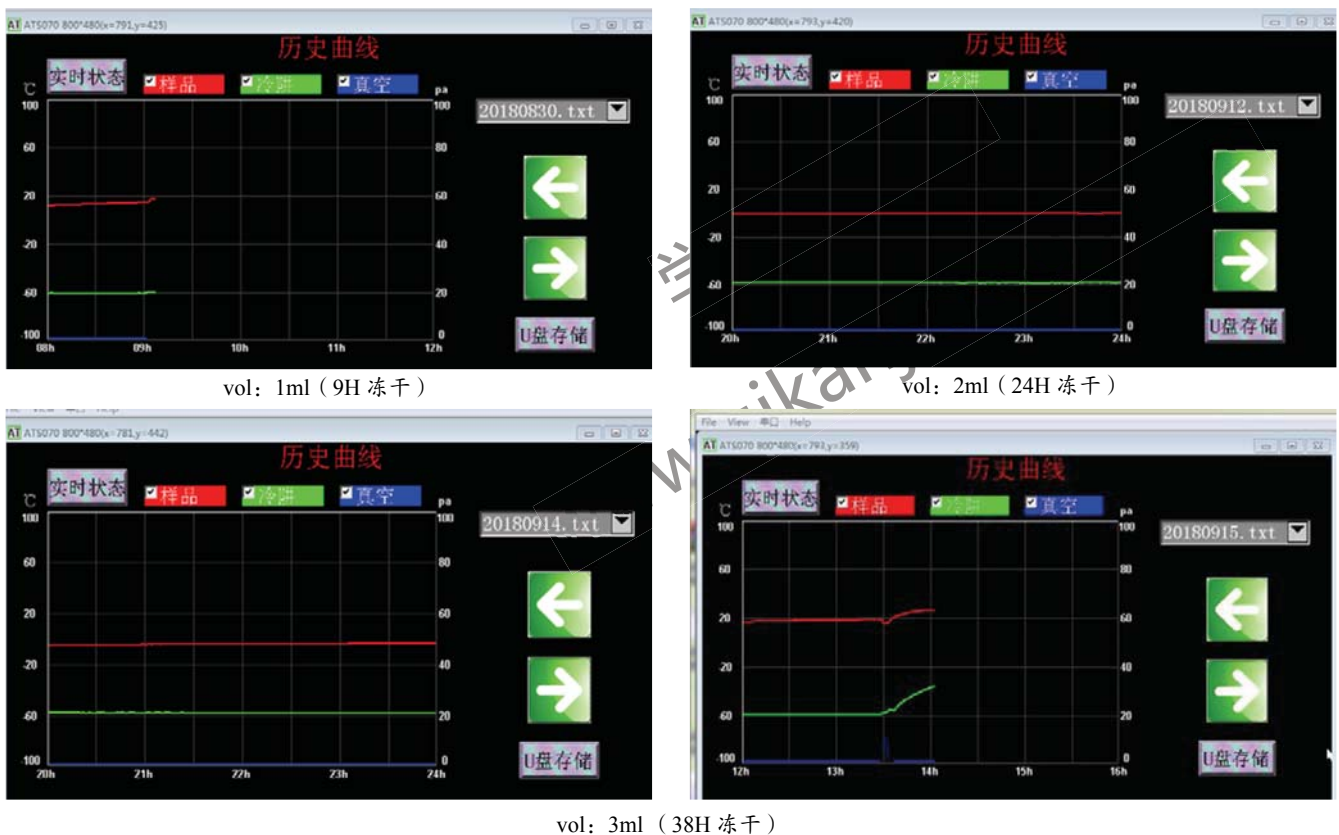


图 2: 不同体积 huc-MSCs 上清液冻干时间曲线

[1] 徐海环, 董化江, 赵明亮. 脐带间充质干细胞上清冻干粉对大耳兔皮肤缺损的治疗作用 [J]. 新乡医学院学报. 2016, 33(12):1041-1043.

[2] 汪润, 于艳秋. 间充质干细胞及其分泌液抗皮肤光老化作用的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报. 2017, 19(4):356-359.

[3] HE H,ZHAO Z H,HAN F S,et al. Overexpression of protein ki-nase C varepsilon improves retention and survival of transplanted mesenchymal stem cells in rat acute myocardial infarction[J].Cell Death Disease,2016,7(417) : e2056.

[4] 丛秀丽, 王学军, 崔磊. 中国整形美容协会抗衰老分会《干细胞抗衰老技术规范化指南》[J]. 中华保健医学杂志, 2017, 19(2):185-186.

[5] Almeida EV, De Brito SL. Alkaline degradation of lyophilized DMSA prior to labeling with 99m Tc: Identification and development of the degradation pathway by HPLC and MS. Nucl Med Biol. 2018;57: 20-27.

[6] 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.