

人脐带间充质干细胞致瘤性试验*

许键炜^{1,2}, 何志旭^{1,3**}, 舒莉萍^{1,4}, 王凤昌¹

(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 药理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院附属医院 儿科, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵阳医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察人脐带间充质干细胞对裸鼠的致瘤性。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注射裸鼠。观察8周裸鼠体内有无肿瘤生长。结果: 裸鼠注射细胞后无明显不适, 8周观察期内裸鼠体内未见肿瘤生长, 病理组织学检测未见异常。结论: 人脐带间充质干细胞导致肿瘤发生的可能性低。

[关键词] 脐带; 间充质干细胞; 细胞, 培养的; 小鼠, 裸; 免疫组织化学; 致瘤性试验

[中图分类号] R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)01-0017-03

Tumorigenicity Test of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

XU Jianwei^{1,2}, HE Zhixu^{1,3}, SHU Liping^{1,4}, WANG Fengchang¹

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

2. Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department

of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

4. Department of Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate nude mice's tumorigenicity caused by human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs). **Methods:** Cultured and amplified HUCMSCs, and prepared into cell normal saline hypodermic injection used for injecting nude mice. Tumor growth condition was observed for eight weeks. **Results:** Mice had no obvious adverse reaction, 8 weeks of tumorigenicity study showed that no tumor developed. Histopathologic examinations also showed no abnormality. **Conclusions:** The possibility of HUCMSCs lead to tumor growth is very low.

[Key words] umbilical cord; mesenchymal stem cells; cell, cultivated; mice, nude; immunohistochemistry; tumorigenicity test

近年来,干细胞技术在生命科学领域得到越来越多的应用。利用干细胞修复受损组织可重建其功能,在肝硬化、类风湿性关节炎、糖尿病、脑瘫、脊髓损伤、骨折不愈合、视网膜色素变性等诸多疾病的治疗中疗效良好^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最初发现存在于骨髓中,目前已能从脐带、脐血和羊水中分离和制备^[2]。MSCs具有免疫调控、造血支持、连续传代和冻存后仍有自我复制和多向分化潜能等特点,在特定的诱导条

件下,可分化为多种组织细胞,可作为种子细胞用于组织器官损伤修复和抗衰老^[3]。脐带来源的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)因其增殖能力强、取材方便,在转化医学和组织工程中展现出广阔的应用前景^[3]。但有关干细胞的安全性存在一定争议,有学者认为肿瘤源自干细胞^[4]。因此,作为种子细胞的MSCs的安全性是临床前研究必须明确的基本问题。裸鼠由于其先天胸腺缺失,T、B淋巴细胞

*[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(2013020)];贵州省教育厅自然科学研究项目[黔教合KY字(2012036)]

**通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn

网络出版时间:2014-11-27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20141205.1507.002.html>

功能和胸腺依赖免疫功能完全缺乏,是致瘤实验的理想动物^[5]。本试验旨在通过 HUCMSCs 对裸鼠的致瘤性试验,为临床使用 HUCMSCs 提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

新生儿脐带(贵阳仁爱医院妇产科提供),胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司),0.25%胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),无血清培养基(美国 Gibco 公司),L-DMEM 培养液(美国 Gibco 公司),流式检测试剂盒(PE、APC、FITC、Cy5.5,美国 BD 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司),倒置相差显微镜(日本 PANASONIC 公司),流式细胞仪(MOFLO,美国贝克曼库尔特公司)。Balb/c 裸鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK,2009-0004)。

1.2 方法

1.2.1 HUCMSCs 培养及鉴定 无菌操作下采集符合条件(产妇年龄 20~35 岁,健康,无各种遗传、传染性疾病;胎儿足月,健康,体重超过 2.5 kg)新生儿的 10~15 cm 长脐带一条,去除脐带动静脉血管和外膜层,取华尔通胶,剪刀剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm,平铺接种于 75 cm² 培养瓶,加入含 10% FBS 的 L-DMEM 液 10 mL,培养箱 5% CO₂, 37 °C 饱和湿度培养,倒置相差显微镜观察,5 d 后半换液,以后每 4~5 d 全换液,待细胞融合达 50% 以上去除华尔通胶,继续培养。细胞融合至 80%~90% 传第 1 代,之后加用含有生长因子的无血清培养基。传至第 4 代,应用流式细胞仪检测细胞膜表面分子 CD90、CD44、CD105、CD73 的表达。

1.2.2 实验分组及观察 参照《中华人民共和国药典》三部(2010 版)标准^[6],取 8 周龄,体重 18~20 g 的雌性 Balb/c 裸鼠 10 只。按随机数字表法分为对照组和实验组,每组 5 只。动物在具有独立通气笼盒(IVC)的 SPF 级屏障系统条件下饲养。室温控制在 26~28 °C,相对湿度保持在 40%~60%。标准饲养盒内喂养,每盒 2~3 只,每日照明 12 h。实验组裸鼠于单侧前、后腿内侧皮下分别接种培养至第 4 代的含 HUCMSCs 1×10^9 /L 的细胞悬液 0.5 mL。对照组同一部位注射等量生理盐水。观察裸鼠 8 周内有无瘤体生长及其他不良反应发生;于注射后第 8 周末处死裸鼠,并行常规组织病理学检查。

2 结果

2.1 HUCMSCs 的培养、鉴定及收集

2.1.1 细胞培养 接种约 1 周可见细胞贴壁生长。接种 2 周左右细胞融合达 50%,呈梭形、流水样生长分布;培养 3 周左右,细胞融合达 80%~90%。加用含有生长因子的无血清培养基后,生长迅速。1 传 2,3~5 d 可传下一代。见图 1。

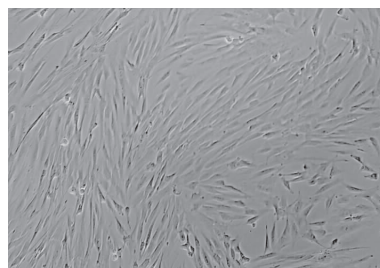


图 1 培养至第 4 代的人脐带间充质干细胞(40 ×)

Fig. 1 HUCMSCs cultured to the fourth generation

2.1.2 流式细胞鉴定 流式细胞仪检测结果显示,培养至第 4 代的细胞,流式检测显示 CD105 +、CD90 +、CD73 +、CD44 +, NOT-HUCMSCs -。见图 2。

2.1.3 HUCMSCs 收集 细胞使用前弃培养液,生理盐水洗涤两遍后加入 0.25% 胰蛋白酶 2 mL,置 37 °C 培养箱消化 3 min,等量 L-DMEM 液终止消化。吸管吹打使贴壁细胞游离,后收集入离心管 800 r/min 离心,生理盐水洗涤两遍重悬成细胞悬液备用。台盼蓝染色计数活细胞数达 90% 以上。

2.2 裸鼠注射 HUCMSCs 后观察

8 周观察期内裸鼠未见明显不良反应,无死亡。注射 HUCMSCs 悬液第 8 周末,经处死解剖未见瘤体形成。病理检查示正常组织结构,未见有集落形成及特殊病变。见图 3。

3 讨论

MSCs 具有分化形成多种成熟细胞的能力,特别是其跨胚层、跨系统的分化潜能,对多系统疾病的治疗、器官的重建以及损伤的修复有着重大的影响。HUCMSCs 作为一类免疫缺陷细胞,异体移植免疫排斥反应弱,不同个体之间的移植,不需配型即可使用^[9-10]。MSCs 独特的生物学特征在再生医学中展现出诱人的应用前景,成为了研究的热点。裸鼠具有免疫缺陷特点,异种移植时不产生排

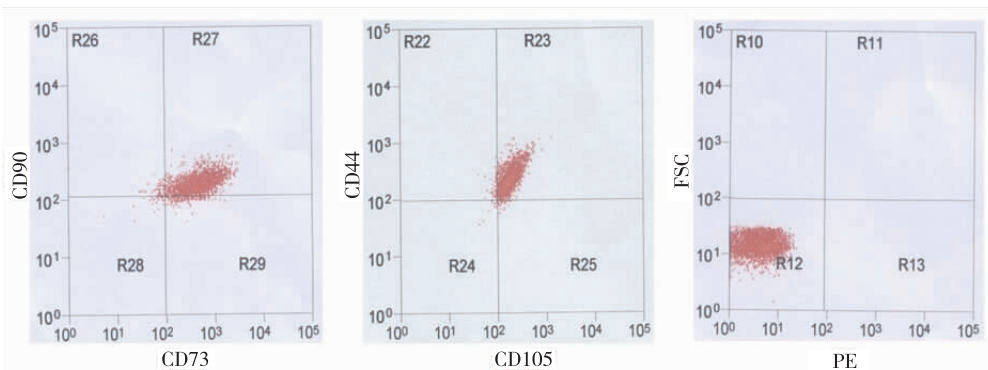


图2 HUCMSCs 免疫表型

Fig. 2 The immunophenotype of HUCMSCs

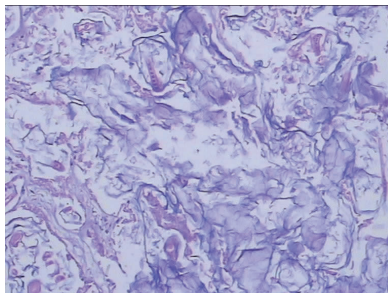


图3 裸鼠注射 HUCMSCs 部位病理学结果(HE, ×40)

Fig. 3 Histopathologic findings on HUCMSCs injection site of nude mice

斥反应^[5],在裸鼠皮下接种已知可致瘤(或癌)性细胞可生长成具有原发瘤组织形态、染色体组型及免疫特点的实体瘤^[11-12]。因此,在药品、生物制品的安全性评价领域以及免疫、肿瘤研究中占据愈来愈重要的地位。

胚胎干细胞移植可形成多种畸胎瘤已被学界公认,Houghton 等^[13]报道骨髓源性干细胞移植可导致胃癌,Matsubara 等^[14]认为干细胞导致的新生血管可能形成血管瘤。本试验通过机械法分离、培养、扩增可获得大量 HUCMSCs,将传至第4代的 HUCMSCs 进行流式细胞仪检测显示 CD105 +、CD90 +、CD73 +、CD44 +、NOT-HUCMSCs -,符合 MSCs 的生物学特征^[7-8]。将 HUCMSCs 移植在 Balb/c 免疫缺陷裸鼠皮下,细胞用量按公斤体重计,为临床通常用量的 500 倍。增加干细胞的移植数量,就会加大致瘤的风险^[15]。但经 8 周后解剖学及病理组织学检查未发现异常。通过其对裸鼠的致瘤性研究,结果初步表明,经过短期传代培养的 HUCMSCs 不具有致瘤性,这与文献^[16]报道相符。HUCMSCs 容易获得,采集对产妇和新生儿均

不会带来任何创伤和不良反应,且病原微生物感染及传播几率相对较低,亦不涉及法律和伦理方面的争议,是组织工程理想的种子细胞,实验结果初步表明其传代早期的细胞应用于临床是安全的。目前其临床应用尚处于起步阶段,有关 HUCMSCs 移植的适应症、禁忌症、并发症、远期疗效和远期的安全性等问题仍需大量长期的实验及临床观察。

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] 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.
- [3] 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.
- [4] 李六金,李秦,施新猷,等. 五种动物传代细胞系对裸鼠的致瘤性[J]. 第四军医大学学报, 2000(6):738-740.
- [5] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004(1):1-28.
- [6] 国家药典委员会编写组. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:14-17.
- [7] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction [J]. Nat Med, 2006(4):459-465.
- [8] 许键炜,申长清,赵芳芳,等. 同源异体间充质干细胞上清液干预大鼠佐剂性关节炎研究[J]. 贵阳医学院学报, 2013(4):339-343.
- [9] Zhou CH, Yang B, Tian Y, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes [J]. Cell Immunol, 2011(1):33-38.

(下转第 23 页)

层细胞;(4)细胞传代用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化 5 min,立即加入胰蛋白酶体积 3 ~ 4 倍 10% 胎牛血清的 M199 培养液终止消化,减少了细胞的损伤;(5)用明胶包被细胞培养瓶可以促进内皮细胞的贴壁性;(6)本研究在传代过程中发现原代 HUVECs 传至第 5 代后形态有所改变,贴壁性较差的现象,采用细胞传代至第 5 代时进行研究,即可保持细胞的活性,还可保证实验结果真实可靠。

本研究获得的原代 HUVECs,镜下细胞呈长梭形,以“鹅卵石”状排列,免疫组织化学染色示细胞呈圆形、梭形或多边形,胞浆内含有棕黄色颗粒,流式细胞术检测细胞表面抗原 CD31 表达阳性高达 99.37%,成功分离并获得大量纯度较高的 HUVECs。为 HUVECs 模型模型的建立提供更加简便、快速的方法。

4 参考文献

- [1] Xiao L, Liu Y, Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014(306):H317-H325.
- [2] Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction-a major mediator of diabetic vascular disease[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis*, 2013(1832):2216-2231.
- [3] Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002(34):1508-1512.
- [4] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance[J]. *Circulation*, 2007(115):1285-1295.
- [5] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders[J]. *Blood*, 1998(91):3527-3561.
- [6] Trung DT, Wills B. Systemic vascular leakage associated with dengue infections the clinical Perspective[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010(338):57-66.
- [7] Jaffe EA. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins[J]. *Clin Invest*, 1973(52):2754.
- [8] 张宝庚,陈铁镇,张晶范. 人脐带静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养[J]. *中华心血管病杂志*, 1985(1):52-54.
- [9] Crampton SP, Davis J, Hughes CC. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [J]. *J Vis Exp*, 2007(3):183.
- [10] 余继海,许戈良,傅斌生. 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定 [J]. *安徽医学*, 2003(24):4-6.
- [11] 钱勇,张励. 内皮细胞生长因子和肝素对人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. *眼科研究*, 2003(21):26-28.
- (2014-09-08 收稿,2014-10-15 修回)
- 中文编辑:刘平;英文编辑:赵毅

- (上接第 12 页)
- [4] Werner ME, Chen F, Moyano JV, et al. Caspase proteolysis of the integrin beta4 subunit disrupts hemidesmosome assembly, promotes apoptosis, and inhibits cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2007(8):5560-5569.
- [5] Poteca T, Comanescu M, Poteca A, et al. The many faces of triple negative breast cancer[J]. *Chirurgia*, 2014(4):471-479.
- [6] 胡晓霞,霍建云,张金娟,等. 钙激活中性蛋白酶-2 对整合素 $\beta 4$ 水解的影响[J]. *贵阳医学院学报*, 2015(1):1-5.
- [7] 罗浩军,杨光伦,涂刚雄. 激素受体 GPR30 研究进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2009(11):881-886.
- [8] Dennis MK, Burai R, Ramesh C, et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009(6):421-427.
- (2014-12-01 收稿,2014-12-25 修回)
- 中文编辑:文箐颖;英文编辑:周凌

- (上接第 19 页)
- [10] 崔冬冰,何志旭,李永念,等. 人羊膜间充质干细胞的分离与鉴定[J]. *贵阳医学院学报*, 2014(1):8-11.
- [11] Hua JL, Qi u BP, Zhu HJ, et al. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells[J]. *A Fric J of Biochem Res*, 2011(4):113-123.
- [12] Zhang J, Chen GH, Wang YW, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction[J]. *Chin Med J*, 2012(19):3472-3478.
- [13] Houghton JM, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells[J]. *Science*, 2004(5701):1568-1571.
- [14] Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and GC SF cytokine therapy[J]. *Lancet*, 2004(9411):746-747.
- [15] Kuroda Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived product[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013(2):189-192.
- [16] 聂德志,宛莹,贲亮,等. Balb/c 裸鼠体内的干细胞致瘤实验[J]. *中国组织工程研究*, 2014(6):888-893.
- (2014-10-10 收稿,2014-11-25 修回)
- 中文编辑:吴昌学;英文编辑:赵毅