

间充质干细胞冻存方法的研究进展*

付旭锋^{1,2}, 刘平¹, 陈冰冰^{2,3}, 焦扬^{1,4}, 司维^{2,3}, 郑冰蓉¹

(1. 云南大学 医学院, 云南 昆明 650091; 2. 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 云南 昆明 650500;

3. 昆明理工大学 灵长类转化医学研究院, 云南 昆明 650504;

4. 昆明医科大学 云南省干细胞与再生医学重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞,它能够发育成硬骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞,因此已成为细胞治疗的重要候选种子细胞,特别在各种退行性疾病和自身免疫性疾病的组织修复和免疫调节方面有良好的应用前景.有效的应用须建立在有生物学特性保持良好的充足 MSCs 的前提下.由于临床上细胞移植的供体和受体往往存在不同时性,很难保证即离即用,且充足的数量需求保证也会是一个问题.因此,能保证良好生物学特性稳定保持的 MSCs 冻存方法就显得尤为重要.本文即对 MSCs 冻存技术的研究进展进行综述.

关键词: 间充质干细胞; 细胞冻存; 冷冻保护剂

中图分类号: Q 2-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 0258-7971(2016)04-0652-09

1 间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)概述

1.1 MSCs 的来源与鉴定特征 早在 1927 年, Friedenstein 和同事从小鼠骨髓中分离细胞时观察到其中呈梭状的细胞有着稠密的细胞质和较大细胞核,数天后扩大呈多边形并产生集落形成单位,在生长的过程中保持梭状或者成纤维状,而且发现将这些细胞注射至皮下组织后能够重建造血微环境^[1].这类可从中胚层和外胚层组织中分离得到的成体结缔组织细胞被称为间充质基质细胞(Mesenchymal stromal cells, MSCs).后来, Caplan 在 1991 年开始使用“间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)”一词,特指从骨骼、软骨、肌腱、韧带、脂肪、皮肤、肌肉和骨髓等中胚层来源的组织中分离出的结缔组织干细胞^[2].

骨髓曾经被认为是 MSCs 的主要来源,但骨髓的收集对患者和志愿者的伤害较大、所含的 MSCs 的比率也仅有 0.001%~0.01%,且这一比例会随着

年龄的增长而下降^[3].随着近年来的不断探索,现 MSCs 已可以从脂肪组织^[4]、关节软骨^[5]、大脑^[6]、牙髓^[7]、子宫内膜^[8]、月经血^[9]和皮肤^[10]等许多成人组织中分离得到.此外,新生儿的羊水^[11]、羊膜^[12]、胎盘^[13]、脐带^[14]和脐带血^[15]等组织中也都含有丰富的 MSCs 细胞,其中脐带血中的造血前体细胞是患有造血系统疾病的主要移植来源,非造血的 MSCs 则成为细胞治疗的良好材料^[16].

MSCs 具有以下鉴定特征:细胞呈梭状或纤维状且对塑料的培养皿表面有很强的吸附能力;没有特异的标签分子,可表达 CD73、CD90、CD105、CD44,但不表达 CD34、CD45、CD14 和 HLA-DR;在特异的诱导培养基中可分化为脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞^[3].因此, MSCs 鉴定的主要依据是形态、表面分子和三系分化能力.

1.2 MSCs 的生物学功能特性 近年来的研究发现, MSCs 不但具有免疫调节潜能,还具有监视和控制炎症反应的作用^[17].在炎症反应的初始阶段,体

* 收稿日期: 2016-03-11

基金项目: 云南大学研究生科研创新项目(YNUY201455).

作者简介: 付旭锋(1988-),男,甘肃人,博士,主要从事干细胞应用基础研究.E-mail: fuxufeng100@163.com.

通信作者: 司维(1976-),男,青海人,博士,教授,硕士生导师,主要从事干细胞应用研究.E-mail: siwei76@hotmail.com;

郑冰蓉(1969-),女,广东人,博士,教授,博士生导师,主要从事人类分子遗传学研究.E-mail: zhengbr@ynu.edu.cn.

内的 MSCs 能够被相关的细胞因子激活并且能够行使抑制 T 细胞增殖和下调促炎症因子如肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素等^[18-19]. MSCs 还能够通过释放趋化因子在炎症位点招募巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞而引发先天性的免疫应答^[20-21]. 有报道称 MSCs 能够通过趋化作用迁移至炎症位点影响 B 细胞、NK 细胞、树突状细胞和巨噬细胞来发挥作用^[22].

最新的研究还发现, MSCs 能够分泌引起免疫调节、抗凋亡、抗纤维化、抗炎症、促血管形成、趋药性和在损伤组织刺激组织再生的生长因子和细胞因子等生物活性分子^[23-24]. MSCs 似乎不是通过直接的分化和直接替换损伤细胞来达到组织再生的目的, 而是可能通过分泌一些生物分子刺激损伤组织而达到修复再生的效果^[25]. 这些因子的相互作用能够促进心血管的形成、抗凋亡, 促分裂、抗纤维化、促前体细胞趋化和提供有利于干细胞分化的微环境^[22, 26].

进一步的研究显示, 在人体内, MSCs 能够通过细胞信号通路使其他细胞“归巢”至组织损伤位点^[27]. 有实验研究, MSCs 通过静脉注射后大多数堆积在肺部静脉, 随后逐渐迁移至肝脏、脾脏和肾脏等损伤位点^[28-29]. 虽然注射的 MSCs 在体内的寿命有限, 但 MSCs 可以被组织的损伤位点表达的基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 的浓度梯度通过 MSCs 表面的 CXCR4 (SDF-1 的受体) 招募至损伤位点而发挥作用^[30]. 此外, CXCR4 在人脐带血分离出的 MSCs 上还具有提高组织修复的功能^[31]. 此外, MSCs 不仅能够分化成中胚层细胞, 而且能够分化成外胚层的神经元和内胚层的肝细胞^[32], 在再生医学和组织修复方面具有良好的应用价值.

除上述生物学特性以外, 这里要特别提到的 MSCs 具有易于扩大培养和稳定传代的重要性^[33-34]. 该特点是 MSCs 在细胞治疗和再生医学上具有广阔应用前景的重要基础, 它不仅可以解决临床上细胞移植的供体和受体存在的不同时性, 而且可以减少新的组织和器官的需要、保证需求和来源的质量控制、提供足够的时间在细胞移植前筛查供体细胞的可移植性^[35]. 事实上, 目前临床使用的 MSCs 大多就是经体外培养、低温保存后的. 但有研究显示用早期代数的 MSCs 的治疗效果要比晚期的效果好, 这可能与 MSCs 的分化能力会随细胞的

传代而降低有关^[36]. 还有研究认为来自人类羊膜的 MSCs 长时间培养后会容易导致基因型改变、染色体畸变和表型不稳定^[37-38]. 因此, MSCs 的早期冻存是维持其移植时细胞状态和有效性的必要条件, 研究细胞在冻存过程中发生的物理变化反应, 找到对 MSCs 的存活与功能影响最小的冻存方法, 是干细胞用于细胞治疗的挑战之一^[39].

2 MSCs 的冷冻保存

2.1 影响 MSCs 冻存效率的重要因素

2.1.1 冻存速率 冷冻保存的目的是在液氮的低温环境下减缓细胞的代谢活动并维持生命. 在细胞悬液的冷冻过程中, 冰晶的形成是导致细胞死亡的主要原因之一. 避免冰晶的形成就要保持冷却速率缓慢, 以使冻存保护剂逐渐进入细胞内部形成浓度梯度. 当冷却持续进行时, 细胞内的水分在冻存剂的渗透压力下逐步流出细胞, 当细胞内的冻存剂浓度达到最大时细胞就会完全脱水皱缩达到最佳冻存状态. 如果冻存速率太快就不能让细胞内的水分完全出胞, 从而导致细胞内的冰晶形成而对细胞造成损伤. 但冻存液对细胞有一定毒性作用, 冻存速率过低会导致细胞在冻存液中暴露的时间过长而导致细胞受毒. 由冻存保护剂造成的细胞毒性和细胞内冰晶造成细胞损伤这两种冻存伤害已被广泛认同^[40-41]. 所以低温保存细胞需要适当的冷却速率, 以保证在达到冻存温度时使细胞遭受的冻存剂的毒性和冰晶的损害达到最小. 不同的细胞类型有不同的膜透性参数, 所以最佳的冻存速率也不同. 如小鼠骨髓间充质干细胞的最佳冻存速率是 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 而人血红细胞的却是 $1\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ^[42]. 有研究比较了人和小鼠的 MSCs, 发现小鼠的 MSCs 复苏存活率是 $91.5\% \pm 5.6\%$, 而人的是 $82.9\% \pm 4.3\%$, 这是因为小鼠的 MSCs 体积较小, 其表面积与体积比大于人 (小鼠 MSCs 表面积与体积比为 $0.65\ \mu\text{m}^{-1}$, 而人 MSCs 的为 $0.34\ \mu\text{m}^{-1}$)^[43]. 可见, 冻存速率的控制对不同细胞的冻存是非常重要的.

2.1.2 冷冻保护剂 除了冷冻速率, 冷冻保护剂也是减小冻存损伤需要考虑的重要因素之一. 冷冻保护剂根据穿过细胞膜的能力被分为渗透性保护剂和非渗透保护剂^[44]. 渗透性冷冻保护剂有二甲亚砜、丙三醇、乙二醇、丙二醇、甲醇、乙醇、丙醇、甲酰胺等, 主要作用是防止细胞内冰晶形成、避免高浓度冻存剂的毒性和使细胞在耐受度内脱

水^[45].渗透性保护剂的保护能力是由许多小分子构成的高溶解度的水溶性复合物,在高浓度下能够降低水的冰点,因此在冷冻过程中降低了大量冰晶的形成^[46-47].非渗透性冷冻保护剂有海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、聚合物羟乙基淀粉和聚乙烯吡咯烷酮,它们能够在较低的浓度下保护细胞,但要求更高的冷冻速率^[44].如聚合物羟乙基淀粉不能渗入导致细胞外的浓度增大,在低温下形成反渗透而脱水起到保护作用.换言之,非渗透性冷冻保护剂集中在细胞外导致细胞脱水主要是在冷冻的初始阶段^[46].海藻糖的保护作用是和脂膜之间的相互作用,在冻存和复苏的过程中保持了蛋白质的稳定性,而且能够形成玻璃化基质抑制细胞内冰晶产生^[48].但即便是非渗透性的保护剂,也是能引起细胞损伤的.所以研发最有效的冻存剂也是目前细胞冻存的挑战之一.现已有研究开始关注非渗透性保护剂对细胞的毒性机制,以期使其毒性降至最低^[49-50].

2.2 MSCs 的常规冻存方法 目前实验室常规的 MSCs 冻存方法是用含 5% 或 10% DMSO 和人血清白蛋白的冻存液,以一定的冻存速率从室温降到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后放入液氮中或液氮气相中^[51].然而,这个方法是根据冻存造血干细胞和淋巴细胞的方法改进的,并不是冻存 MSCs 的最佳方法^[33].在细胞冻存过程中,对细胞损伤的减轻不仅取决于细胞悬浮或黏附成团,而且还和细胞的来源有着很重要的关系.有研究显示,来自不同组织的 MSCs 冻存后的复苏存活率也明显不同,如从脂肪组织分离的 MSCs 要比从骨髓和骨髓中分离得到的复苏存活率要高^[52].因此,对 MSCs 冻存复苏后的物理和生物过程的研究是优化冻存方法的基础,以此保证 MSCs 维持结构完整和功能特性.

为比较冻存率、冷冻保护剂和冻存时间对 MSCs 的影响,研究者们做了大量的研究.早在 1997 年,有研究将人骨髓 MSCs 用 10% 的 DMSO 在 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后冻存在液氮中,24 h 复苏后传代到 15 代依然保持成骨分化的能力^[53].随后,有研究用 10% 的 DMSO 将从人骨髓中分离得到 MSCs 在 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后在液氮中保存 7 d,和未冻存的 MSCs 相比在增殖速率和成骨分化能力上没有显著的差异^[54].有研究将人脐带血 MSCs 用 10% DMSO 和 10% FBS 的冻存液冻存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后在液氮中保存,用台盼蓝染色的方法得到保存了

5 a 的存活率为 $80\% \pm 10\%$,冻存 2 a 的为 $89\% \pm 5\%$,并且复苏后仍有成纤维的形态,并能检测到 CD73、CD90 和 CD105 表面抗原,用茜素红染色钙沉积和阿尔新蓝染色蛋白聚糖的方法表明复苏后的 MSCs 仍然保持着成骨和成软骨的分化能力^[55].这些研究的重点都是在 MSCs 冻存后的最高细胞存活率和功能,最大化保证冻存后的 MSCs 和最新分离出来的 MSCs 表现相同特性.总之,只有当 MSCs 冻存复苏后仍有较高的活力、增殖性和功能性时,才可以用于细胞移植.

2.3 对 MSCs 常规冻存方法的优化

2.3.1 低浓度的 DMSO DMSO 是常用的 MSCs 冻存保护剂,但是冻存后潜在的毒性植入动物模型体内会有不良反应^[56],包括恶心、头痛、血压不稳定、腹泻等症状.有临床报道称注射了含有 DMSO 的造血干细胞后引起了腹部疼痛性痉挛^[57-58].因此,用于临床的细胞,冻存过程中降低 DMSO 的含量是必须的.目前已相继有基于不同浓度 DMSO 冻存的研究: Ross-Rodriguez 等在无 DMSO 和其他渗透性冻存保护剂存在的条件下成功地冻存了人造造血干细胞^[41,59]; Zeisberger 等用标准的冻存液(10% DMSO 和 90% FBS)和无血清培养基中添加 2%、5% 或 10% 的 DMSO 冻存人脂肪 MSCs,在 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率下降温至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,2 h 以后放入液氮中至少 24 h,复苏后显示无 DMSO 和 2% 的冻存液中没有细胞存活,通过扫描电子显微镜观察发现,在没有或低浓度的 DMSO 的细胞膜内外有冰晶导致的表面穿孔,然而在 5% 和 10% 的 DMSO 的细胞存活率、膜完整性和三系分化并没有显著的差异^[60]; Naaldijk 用不同冻存速率冻存小鼠骨髓 MSCs 的结果显示,DMSO 的质量分数在 4% 以上会明显降低细胞活力^[61]; Petrenko 等在完全没有 DMSO 和血清的条件下,用乳糖、蔗糖、海藻糖等糖类冻存人皮肤的 MSCs,显示存活率是 60% 以上,并且在形态、成骨和成软骨的分化能力上和未冻存的并没有明显的差别^[62].上述研究提示,研发低浓度或无 DMSO 冻存液在临床 MSCs 冻存上无疑是可行的,也是必然趋势.

2.3.2 无动物血清配方 大多数的冻存方法都是含有动物血清的,其浓度范围从 5% 到 90% 不一.动物血清除了可为细胞提供营养之外,在低温长期存储时还有稳定细胞膜、调整渗透压和避免自由基形成的作用.然而对临床使用的细胞而言,动物血清

的存在并不一定合适,因为一是动物血清有携带传播病毒的风险(如朊病毒或一些引起免疫反应的蛋白质),二是血清的组分、来源和生产批次对培养的细胞可能会有不良或不一致影响.因此,积极研究生产一种替代血清的产品很有必要.近年来,在这方面已有了进展,瑞士 Lonza 公司已研发出一种可以培养脐带 MSCs 的无血清生长培养基^[63].研究发现,丙三醇能够通过渗透保护细胞内外不受冰晶形成的破坏,四氢甲基嘧啶羧酸可作为渗透剂保护细胞免受高盐损伤,脯氨酸能够使细胞散开而充当冷冻保护剂.以此研发的甲基纤维素冻存液(分别用上述三种冷冻保护剂)替代无 DMSO 和无血清冻存液冻存 MSCs,结果显示冻存细胞存活率为 99%,而 1%的脯氨酸和 10%的四氢甲基嘧啶羧酸复合冻存液冻存的存活率也可达到 90%^[64].

2.3.3 混合保护剂 为了研究复合冻存对 MSCs 的影响,有研究将一系列浓度的 DMSO (1%、4%、8%和 10%)和海藻糖(9%、6%和 2%)混合在 90% FBS 冻存人脂肪 MSCs,在 -20 °C 中平衡 30 min 后在 -80 °C 放置 1 h,最后转移到液氮中长期储存(1、6 和 12 个月).用 Annexin-FITC/PI 试剂盒配合流式细胞术分析细胞的复苏存活率,结果显示,与未冻存的细胞相比,4%的 DMSO 和 6%海藻糖的组合冻存液冻存复苏后有 80%以上的存活率,而且在增殖培养 24 h 后没有出现凋亡,依然保持着分化潜能,在形态、免疫表型、增殖和分化潜能上都没有明显差异^[65].如果确实不影响 MSCs 的形态和功能,混合保护剂也不失为一种很好的选择.

2.3.4 添加糖类、抗氧化剂和凋亡抑制剂等添加剂 冻存过程中导致的损伤一般是由细胞在冷冻过程中脱水、氧自由基产生和细胞凋亡酶如 caspase 的激活所致.因此,有报道通过细胞的存活率、过氧化氢酶(抗氧化酶)和 caspase 的抑制剂,研究了能够稳定细胞膜的海藻糖对细胞的影响. SEO 等^[66]用含 2.5%、5%和 10%的 DMSO、60 mmol/L 海藻糖、100 μg/mL 过氧化氢酶和 30 μg/mL zVAD-fmk(caspase 抑制剂)的无血清冻存液在液氮中冻存羊水 MSCs 3 周,结果显示,用 2.5% DMSO 和 3 种添加剂(海藻糖、过氧化氢酶和 caspase 抑制剂)的冻存液和含 10% DMSO 和 30% FBS 的冻存液,在群体倍增、细胞表面抗原表达和成肌细胞分化能力上表现相似.该结果证实了减少 DMSO 和无血清冻存对保持 MSCs 存活率和功能

的可行性.

可吸附在细胞膜上表面活性物可以调节体内许多生物结构的组装和功能^[67].普朗尼克 F68 是一种非离子低泡沫的表面活性剂,有研究显示在真核细胞在冻存过程中有稳定细胞膜功能的作用.用含 0.05%的普朗尼克 F68、10% DMSO 和 20% FBS 冻存牙胚 MSCs,在 -20 °C 保持 15 min 后转至 -80 °C 过夜,最后保存在液氮中.之后分别在 1 d 和 6 月后复苏细胞并分析存活率、凋亡相关基因和特异分化基因.结果显示, F68 能够通过抑制促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 和促进抗凋亡蛋白 p53 的表达增加细胞活力,且存后 F68 不会改变碱性磷酸酶的活性、胶原蛋白和骨钙蛋白的表达及细胞的分化能力.认为 F68 的冷冻保护作用可能是通过改变细胞膜上脂质的构成而达到稳定细胞膜的功能^[68].

硼元素在植物体内可保持细胞壁和细胞膜的完整性,而在动物体内是一种维护骨质的微量元素.在 5% DMSO 冻存液中加入 20 μg/mL 五硼酸钠冻存牙髓 MSCs,在液氮中储存 6 个月后发现,加入硼盐后不仅没有改变 MSCs 表面抗原的表达,而且增强了细胞活力和分化能力,推测硼对细胞的作用是增加了冻存液的渗透性而引起细胞快速皱缩脱水,从而阻止了细胞内冰晶形成的毒害作用^[69].

综上所述,添加剂可以在一定程度上保护细胞在冻存过程中免受损害并保持或促进活性.

2.3.5 磁场中的程序冻存 基于在磁场中非产热型的振动会导致机械的渗透性改变,从而防止胞内冰晶造成的损伤^[70]的原理,有研究用 10%的 DMSO 冻存小鼠骨髓 MSCs,在 -5 °C 保持不同时间(0、5、15 min 和 25 min)后放入不同温度(-20、-30 °C 和 -40 °C)下,得到在 -5 °C 保持 15 min 并且放入 -30 °C 下冻存的 MSCs 的存活率可达到 75.8%的结果.随后在该条件下将冻存的 MSCs 用不同的磁场(0.005、0.1 mT 和 0.2 mT)处理,在 -150 °C 保存 7 d 后复苏并培养 48 h,结果显示在 0.1 mT 时的存活率最高.整个实验结果表明,在 -5 °C 保持 15 min,随后在 -30 °C 中冻存和 0.1 mT 的磁场中处理的冻存 MSCs 有最高的存活率并且保持原有的成骨和成软骨的分化能力^[71].认为若选用的冻存的温度高于最佳结晶温度,细胞会被胞内快速地冰晶损伤,而冻存温度低于结晶温度,细胞会在冻存保护剂中暴露时间过长而造成细胞毒性.若在 -5 °C 保持的时间太短则会导致 DMSO 没有完全渗入细胞会引起

冰晶损伤,但时间较长则又引起 DMSO 对细胞的毒性.

2.3.6 玻璃化冻存 玻璃化是一种利用高浓度冻存保护剂形成的粘性液体在液氮的低温条件下快速冷冻形成玻璃态的一种方法^[72-73],通常 2 个步骤:第 1 步用 20%的乙二醇在室温平衡 5 min;第 2 步用 40%乙二醇、18%聚蔗糖、0.3 mol/L 蔗糖和 20% FBS 的混合冻存液直接放入液氮进行玻璃化.与慢速冻存方法相比,玻璃化是一个柔和且没有冰晶形成的过程.该冻存法现已在胚胎、卵细胞、关节软骨等的冻存中有很好的应用^[74-75],也已逐步在各类干细胞中尝试.人羊膜 MSCs(这类细胞不能承受缓慢冻存所形成的冰晶)用该法冻存的复苏存活率可达到 84.3%±3.2%,且与未冻存的相比,形态、表面抗原表达、胚胎干细胞标记物和三系分化方面均没有明显差异^[76].冻存人脐带 MSCs 的存活率达到 95.54%±2.30%,表面抗原和三系分化能力同样没有改变^[77].

但目前常见的玻璃化冻存所用的都是高浓度的冻存保护剂,对细胞有毒性,而且其中的添加剂也对细胞有轻度危害.调整的做法用 5%乙二醇、35%丙二醇、5%蔗糖和 1%聚乙烯醇玻璃化冻存脐带血,结果显示存活率达到 95.4%^[78].上述提示玻璃化冻存也是可尝试的冻存 MSCs 的方法.

2.3.7 三维支架冻存 用于骨、软骨和皮肤修复用的 MSCs,须在低温贮藏时黏附在生物相容性材料的支架上.为了克服冻存时形成黏附的困难, MSCs 需包裹于藻酸盐的微囊中冻存在三维支架中.藻酸盐是一种自然的多聚糖,具有生物相容性和生物降解性,而且藻酸盐具有吸水保湿的能力,可以防止在冻存的过程中形成冰晶.实验证明:用藻酸盐包裹骨髓 MSCs 冻存在 5%或 10% DMSO 的冻存液中,用 1 °C/min 的速率降至 -80 °C 后放入液氮中,之后检测发现悬液冻存的 MSCs 比藻酸盐包裹冻存在 5% DMSO 中的细胞活力和代谢活性要高,但是和藻酸盐包裹在 10% DMSO 的活性相近;将藻酸盐包裹的 MSCs 冻存在 10% DMSO 中,则有 90%的存活率且保持三系分化能力^[79];进一步地,将脐带 MSCs 铺于静电丝纤维蛋白支架上在复合冻存液(40 mmol/L 海藻糖、40 mmol/L 四氢甲基嘧啶羧酸、100 μg 过氧化氢酶和 2.5% DMSO)中冻存,与未冻存相比,发现细胞活力、增殖与分化和支架的完整性都没有改变^[80].上述研究提示了三维支

架冻存在组织工程和再生医学上的潜在应用价值.

2.3.8 低温保存分离 MSCs 的组织 再生医学和组织工程的发展使得 MSCs 在临床上的使用成为必然.但是 MSCs 的组织来源并不总是在需要的时候获得,所以冻存组织也将变得必要和可行.有一些研究报道从冻存的骨髓、脐带、脂肪和牙髓等组织中分离和培养的 MSCs 与未冻存组织相比,在分化能力上并没有明显的改变.骨髓被认为是经典和传统的 MSCs 来源,低温贮藏骨髓中的干细胞/祖细胞已经被用于造血干细胞的移植.研究显示,从冻存了 4~8 周的骨髓中分离的 MSCs 和未冻存骨髓的 MSCs 都表达同样的表面抗原、增殖潜力和分化能力^[81];被冻存了 20 a 的人骨髓被复苏并培养分离 MSCs,与未冻存的骨髓相比,尽管复苏后的细胞贴壁率只有 50%,但是在培养后能够表现相似的形态、生长曲线、表面抗原和成骨与成脂分化能力^[82].但也有研究认为冻存组织后分离 MSCs 要比分离后冻存 MSCs 的效果差,原因可能是冻存保护剂浸透组织需要更长的时间,导致冻存剂对组织中的 MSCs 造成毒性损伤,而从组织中分离 MSCs 再冻存所用的暴露时间会更短;另外也有研究显示,从冻存组织中分离并单层培养的 MSCs 的基因表达会发生变化^[83].因此,低温保存分离 MSCs 组织的方法的可行性还需要进一步验证.

3 总 结

近年来, MSCs 作为用于细胞治疗的重要候选细胞,关注程度已高于胚胎干细胞和诱导多能干细胞,这是因为一方面 MSCs 有着操作简单的实用性,另一方面, MSCs 具有更高的安全性.且从目前的报道来看,无论分离自何种组织,无论用何种保护剂、保存时间、温度及方法冻存,尽管也会有一些细胞在冻融过程中不可避免死亡或发生生物性能的改变,但存活下来的细胞都仍能保持其增殖和分化潜能^[83].

冻存 MSCs 存在的一些问题也值得注意,例如,与未冻存的 MSCs 比较,冻存复苏后的 MSCs 的免疫调节能力有一定改变、会出现 MSCs 凋亡现象^[84-85]、会影响纤维状肌动蛋白的组装降低归巢能力等^[86-87].因此,未来研究应该关注 MSCs 冻存过程造成的细胞损害和复苏后对细胞造成的影响.针对进一步临床细胞治疗的需要,临床级 MSCs 的冻存还面临着解决降低冻存剂的毒性、消除动物血

清、模拟体内的 3D 支架结构等问题。因此, 尽管上述在 MSCs 冻存上取得了许多有意义和可参考借鉴的成果, 但更为稳定、可靠、有效的临床级 MSCs 的低温冻存体系的建立仍是再生医学工程需要面对的重要挑战之一。

参考文献:

- [1] FRIEDENSTEIN A, CHAILAKHJAN R, LALYKINA K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells [J]. *Cell Proliferation*, 1970, 3(4): 393-403.
- [2] CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991, 9(5): 641-650.
- [3] LI Y, CHARIF N, MAINARD D, et al. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity [J]. *Bio-medical Materials and Engineering*, 2014, 24(s1): 47-52.
- [4] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7(2): 211-228.
- [5] HIRAOKA K, GROGAN S, OLEE T, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage [J]. *Biorheology*, 2006, 43(3,4): 447-454.
- [6] APPAIX F, NISSOU M F, van der SANDEN B, et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(2): 134-143.
- [7] GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(25): 13 625-13 630.
- [8] SPITZER T L, ROJAS A, ZELENKO Z, et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(2): 58.
- [9] ULRICH D, MURALITHARAN R, GARGETT C E. Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013, 13(10): 1 387-1 400.
- [10] RIEKSTINA U, MUCENIECE R, CAKSTINA I, et al. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions [J]. *Cytotechnology*, 2008, 58(3): 153-162.
- [11] SCHERJON S A, KLEIJBURG-van der KEUR C, NOORT W A, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation [J]. *Blood*, 2003, 102(4): 1 548-1 549.
- [12] KIM E Y, LEE K B, KIM M K. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy [J]. *BMB Reports*, 2014, 47(3): 135-140.
- [13] IGURA K, ZHANG X, TAKAHASHI K, et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(6): 543-553.
- [14] ZEBARDAST N, LICKORISH D, DAVIES J E. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC) A mesenchymal cell source for dermal wound healing [J]. *Organogenesis*, 2010, 6(4): 197-203.
- [15] MANCA M, ZWART I, BEO J, et al. Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(1): 54-68.
- [16] BALLEEN K K, GLUCKMAN E, BROXMEYER H E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond [J]. *Blood*, 2013, 122(4): 491-498.
- [17] BERNARDO M E, FIBBE W E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4): 392-402.
- [18] ENGLISH K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2013, 91(1): 19-26.
- [19] PROCKOP D J, OH J Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation [J]. *Molecular Therapy*, 2012, 20(1): 14-20.
- [20] ANKRUM J A, ONG J F, KARP J M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 252-260.
- [21] SHI Y, SU J, ROBERTS A I, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses [J]. *Trends in Immunology*, 2012, 33(3): 136-143.
- [22] DA SILVA MEIRELLES L, FONTES A M, COVAS D T, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(5): 419-427.
- [23] BOOMSMA R A, GEENEN D L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis [J]. *PloS one*, 2012, 7(4): e35685.
- [24] LAVOIE J R, ROSU-MYLES M. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells [J]. *Biochimie*, 2013, 95(12): 2 212-2 221.
- [25] BAULIER E, FAVREAU F, LE CORF A, et al. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells prevent fibrosis and preserve renal function in a preclinical porcine model of kidney transplantation [J]. *Stem Cells Transla-*

- tional Medicine, 2014, sctm.2 013-0186, doi: 10.5966/sctm.2013-0186.
- [26] CAPLAN A I, DENNIS J E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, 98(5): 1 076-1 084.
- [27] KANG S K, SHIN I S, KO M S, et al. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy [J]. *Stem Cells International*, 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/342968.
- [28] CHENG K, RAI P, PLAGOV A, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2013, 94(3): 466-473.
- [29] LI M, LI S, YU L, et al. Bone mesenchymal stem cells contributed to the neointimal formation after arterial injury [J]. *PloS one*, 2013, 8(12): e82743.
- [30] LIU N, TIAN J, CHENG J, et al. Migration of CXCR4 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute injured kidney [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(12): 2 677-2 689.
- [31] MARQUEZ-CURTIS L A, GUL-ULUDAG H, XU P, et al. CXCR4 transfection of cord blood mesenchymal stromal cells with the use of cationic liposome enhances their migration toward stromal cell-derived factor-1 [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(7): 840-849.
- [32] JIANG Y, JAHAGIRDAR B N, REINHARDT R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6 893): 41-49.
- [33] SHARMA R R, POLLOCK K, HUBEL A, et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices [J]. *Transfusion*, 2014, 54(5): 1 418-1 437.
- [34] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(9): 726-736.
- [35] VISWANATHAN S, KEATING A, DEANS R, et al. Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation [J]. *Stem Cells and Development*, 2014, 23(11): 1 157-1 167.
- [36] MOLL G, ALM J J, DAVIES L C, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(9): 2 430-2 442.
- [37] HERVY M, WEBER J L, PECHEUL M, et al. Long term expansion of bone marrow-derived hMSCs on novel synthetic microcarriers in xeno-free, defined conditions [J]. *PloS one*, 2014, 9(3): e92120.
- [38] VACANTI V, KONG E, SUZUKI G, et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2005, 205(2): 194-201.
- [39] WAGNER W, HORN P, CASTOLDI M, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process [J]. *PloS one*, 2008, 3(5): e2213.
- [40] MERYMAN H T. Cryopreservation of living cells: principles and practice [J]. *Transfusion*, 2007, 47(5): 935-945.
- [41] ROSS-RODRIGUEZ L, ELLIOTT J, MCGANN L. Investigating cryoinjury using simulations and experiments. 1: TF-1 cells during two-step freezing (rapid cooling interrupted with a hold time) [J]. *Cryobiology*, 2010, 61(1): 38-45.
- [42] MAZUR P, LEIBO S P, FARRANT J, et al. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells; proceedings of the Ciba Foundation Symposium [M]//WOLSTENHOLME G E W, O'CONNOR M. *The Frozen Cell*, F, 1970 [C]. Wiley Online Library. doi: 10.1002/9780470719732.ch5.
- [43] LIU Y, XU X, MA X, et al. Effect of various freezing solutions on cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species [J]. *Cryoletters*, 2011, 32(5): 425-435.
- [44] MERYMAN H. Cryoprotective agents [J]. *Cryobiology*, 1971, 8(2): 173-183.
- [45] LOVELOCK J, BISHOP M. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide [J]. 1959, 183: 1 394-1 395.
- [46] MCGANN L E. Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents [J]. *Cryobiology*, 1978, 15(4): 382-390.
- [47] MERYMAN H, WILLIAMS R, DOUGLAS M S J. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection [J]. *Cryobiology*, 1977, 14(3): 287-302.
- [48] BUCHANAN S S, GROSS S A, ACKER J P, et al. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line [J]. *Stem Cells and Development*, 2004, 13(3): 295-305.
- [49] ALMANSOORI K, PRASAD V, FORBES J, et al. Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes [J]. *Cryobiology*, 2012, 64(3): 185-191.
- [50] FAHMY M, ALMANSOORI K, LAOUAR L, et al. Dose-injury relationships for cryoprotective agent injury to human chondrocytes [J]. *Cryobiology*, 2014, 68(1): 50-

- 56.
- [51] HANLEY P J, MEI Z, DA GRACA CABREIRA-HANSEN M, et al. Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15 (4): 416-422.
- [52] DAVIES O, SMITH A, COOPER P, et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues [J]. *Cryobiology*, 2014, 69 (2): 342-347.
- [53] BRUDER S P, JAISWAL N, HAYNESWORTH S E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997, 64 (2): 278-294.
- [54] RUST P A, TINGERIDES C, CANNON S R, et al. Characterisation of cryopreserved cells freshly isolated from human bone marrow [J]. *Cryoletters*, 2006, 27 (1): 17-28.
- [55] MARQUEZ-CURTIS L, XU A, JANOWSKA-WIECZOREK A. C-2012: Post-thaw characterization of cord blood-derived mesenchymal stromal cells cryopreserved for up to five years [J]. *Cryobiology*, 2014, 69 (3): 519.
- [56] GALVAO J, DAVIS B, TILLEY M, et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28 (3): 1 317-1 330.
- [57] ALESSANDRINO E, BERNASCONI P, CALDERA D, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 1999, 23 (6): 533-537.
- [58] ROWLEY S, FENG Z, YADOCK D, et al. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade [J]. *Cytotherapy*, 1999, 1 (6): 439-446.
- [59] ROSS-RODRIGUEZ L U, ELLIOTT J A, MCGANN L E. Characterization of cryobiological responses in TF-1 cells using interrupted freezing procedures [J]. *Cryobiology*, 2010, 60 (2): 106-116.
- [60] ZEISBERGER S M, SCHULZ J C, MAIRHOFER M, et al. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells [J]. *Cell Transplantation*, 2011, 20 (8): 1 241-1 257.
- [61] NAALDIJK Y, STAUDE M, FEDOROVA V, et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide [J]. *BMC Biotechnology*, 2012, 12 (1): 49.
- [62] PETRENKO Y A, ROGULSKA O Y, MUTSENKO V V, et al. A Sugar pretreatment as a new approach to the Me₂So- and Xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells [J]. *Cryoletters*, 2014, 35 (3): 239-246.
- [63] WU M, HAN Z-B, LIU J F, et al. Serum-free media and the immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells in vivo and in vitro [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014, 33 (3): 569-580.
- [64] FREIMARK D, SEHL C, WEBER C, et al. Systematic parameter optimization of a Me₂SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells [J]. *Cryobiology*, 2011, 63 (2): 67-75.
- [65] de ROSA A, de FRANCESCO F, TIRINO V, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology [J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2009, 15 (4): 659-667.
- [66] SEO J M, SOHN M Y, SUH J S, et al. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide [J]. *Cryobiology*, 2011, 62 (3): 167-173.
- [67] HERNANDEZ Y G, FISCHER R W. Serum-free culturing of mammalian cells—adaptation to and cryopreservation in fully defined media [J]. *Altex*, 2007, 24 (2): 110-116.
- [68] DOĞAN A, YALVAC M E, YILMAZ A, et al. Effect of F68 on cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from human tooth germ [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171 (7): 1 819-1 831.
- [69] DEMIRCI S, DOĞAN A, ŞIŞLI B, et al. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (1): 139-146.
- [70] KOBAYASHI A, KIRSCHVINK J L. A ferromagnetic model for the action of electric and magnetic fields in cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (2): 163-165.
- [71] KOJIMA S, KAKU M, KAWATA T, et al. Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field [J]. *Cryobiology*, 2013, 67 (3): 258-263.
- [72] FAHY G M, MACFARLANE D, ANGELL C A, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 1984, 21 (4): 407-426.
- [73] JOMHA N M, ELLIOTT J A, LAW G K, et al. Vitrification of intact human articular cartilage [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (26): 6 061-6 068.
- [74] RALL W F, FAHY G M. Ice-free cryopreservation of

- mouse embryos at -196 C by vitrification [J]. *Nature*, 1985, 313: 573-575.
- [75] VAJTA G, HOLM P, KUWAYAMA M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 51(1): 53-58.
- [76] MOON J H, LEE J R, JEE B C, et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells [J]. *Human Reproduction*, 2008, 23(8): 1760-1770.
- [77] MASSOOD E, MARYAM K, PARVIN S, et al. Vitrification of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cryoletters*, 2013, 34(5): 471-480.
- [78] TODOROV P, HRISTOVA E, KONAKCHIEVA R, et al. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver [J]. *Cell Biology International*, 2010, 34(5): 455-462.
- [79] PRAVDYUK A I, PETRENKO Y A, FULLER B J, et al. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells [J]. *Cryobiology*, 2013, 66(3): 215-222.
- [80] BISSOYI A, PRAMANIK K, PANDA N N, et al. Cryopreservation of hMSCs seeded silk nanofibers based tissue engineered constructs [J]. *Cryobiology*, 2014, 68(3): 332-342.
- [81] CASADO-DIAZ A, SANTIAGO-MORA R, JIMENEZ R, et al. Cryopreserved human bone marrow mononuclear cells as a source of mesenchymal stromal cells: application in osteoporosis research [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(5): 460-468.
- [82] SHEN J-L, HUANG Y-Z, XU S-X, et al. Effectiveness of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow cryopreserved for 23 - 25 years [J]. *Cryobiology*, 2012, 64(3): 167-175.
- [83] POLLOCK K, SUMSTAD D, KADIDLO D, et al. Clinical mesenchymal stromal cell products undergo functional changes in response to freezing [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 38-45.
- [84] BAUST J G, GAO D, BAUST J M. Cryopreservation: An emerging paradigm change [J]. *Organogenesis*, 2009, 5(3): 90-96.
- [85] CHINNADURAI R, GARCIA M A, SAKURAI Y, et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(1): 60-72.
- [86] XU X, LIU Y, CUI Z, et al. Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 162(2): 224-231.
- [87] XU X, LIU Y, CUI Z F. Effects of cryopreservation on human mesenchymal stem cells attached to different substrates [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, 8(8): 664-672.

Review of the progress on the cryopreservation methods of mesenchymal stem cells

FU Xu-feng^{1,2}, LIU Ping¹, CHEN Bing-bing^{2,3}, JIAO Yang^{1,4}, SI Wei^{2,3}, ZHENG Bing-rong¹

(1. School of Medicine, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China;

3. School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

4. Key Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs), a population of adult stem cells, are defined by their capacity of self-replicating and differentiation into bones, cartilages, adipose tissues and some other types of cells, which depends on certain stimuli and culture conditions. It has been proved that MSCs have become important candidate cells in cell therapy, especially for tissue repair and immune regulation in degenerative diseases and autoimmunity diseases. As getting high quality MSCs is the base of its clinic application, it is especially important to establish an effective method on cryopreservation. This review is just focus on the developments in cryopreservation of MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs); cell cryopreservation; cryoprotectants