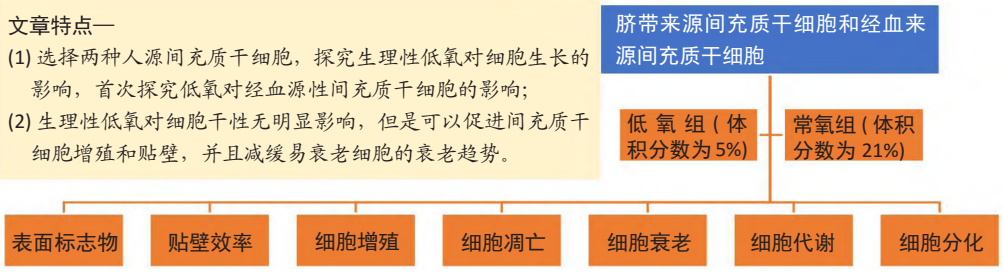
生理性低氧条件下脐带和经血来源间充质干细胞的生物学特性

https://doi.org/10.12307/2022.761
投稿日期：2021-01-29
采用日期：2021-03-31
修回日期：2021-08-02
在线日期：2021-08-21
中图分类号：
R459.9；R318；Q28
文章编号：
2095-4344(2022)30-04819-07
文献标识码：A

莫芸芳[1]，王泽剑[1]，齐念民[2]，陈彦田[1]

文章快速阅读：

文章特点一
(1) 选择两种人源间充质干细胞，探究生理性低氧对细胞生长的影响，首次探究低氧对经血源性间充质干细胞的影响；
(2) 生理性低氧对细胞干性无明显影响，但是可以促进间充质干细胞增殖和贴壁，并且减缓易衰老细胞的衰老趋势。



文题释义：

经血源性间充质干细胞：从女性经血样品中分离得到的成体干细胞，取材方法对捐献者无损伤，是治疗多种生殖疾病的理想种子细胞。

生理性低氧：细胞体外培养的氧体积分数在20%左右，而正常人体内的氧体积分数在5%左右，这种低于外界大气压适度的氧体积分数称为生理性低氧。

摘要

背景：间充质干细胞具有治疗糖尿病、移植物抗宿主病、卵巢早衰等多种疾病的潜能，但是传统培养方法存在着细胞增长缓慢、容易衰老等问题。生理性低氧有望改善间充质干细胞的生物学性能，因而有可能作为优化的培养方法。

目的：探究生理性低氧对脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞生物学特性的影响。

方法：将脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞分别在21%、5%氧体积分数条件下培养，测定细胞的表面标志物、贴壁效率、增殖能力、细胞凋亡、细胞衰老、葡萄糖乳酸代谢和细胞分化等指标。

结果与结论：①低氧可以促进两种来源间充质干细胞的增殖，低氧条件下两种来源间充质干细胞的群体倍增时间均减小(脐带：$P < 0.001$；经血：$P < 0.05$)；②低氧条件下，两种细胞乳酸代谢增强(脐带：$P < 0.05$；经血：$P < 0.01$)，脐带间充质干细胞葡萄糖代谢增多($P < 0.001$)；③低氧抑制高代数经血源性间充质干细胞的衰老；④低氧提高两种来源间充质干细胞的贴壁效率($P < 0.01$)；⑤低氧对两种来源间充质干细胞的干性没有影响；⑥结果提示，生理性低氧可以改善脐带和经血来源间充质干细胞的增殖能力和贴壁效率，可以对衰老细胞起到抗衰老作用，同时对表面标志物无显著性影响。此外，低氧对不同来源间充质干细胞在分化上的影响存在着差异。

关键词：干细胞；间充质干细胞；生理性低氧；生物学特性；增殖；衰老；代谢；分化

Biological characteristics of umbilical cord and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells under physiological hypoxia

Mo Yunfang[1], Wang Zejian[1], Qi Nianmin[2], Chen Yantian[1]

[1]School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; [2]Shanghai Likun Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201400, China

Mo Yunfang, Master candidate, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Corresponding author: Chen Yantian, MD, Assistant researcher, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells have the potential to treat various diseases such as diabetes, graft-*versus*-host disease, and premature ovarian failure. However, traditional culture methods have problems such as slow growth rate and senescence. Physiological hypoxia is expected to improve the biological characteristics of mesenchymal stem cells, which can optimize the culture method.

OBJECTIVE: To explore the effects of physiological hypoxia on the biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells.

METHODS: Umbilical cord mesenchymal stem cells and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells were cultured under 21% and 5% oxygen concentrations. Cell surface markers, colony formation, proliferation, apoptosis, senescence, glucose and lactate metabolism and differentiation were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hypoxia can promote the proliferation of umbilical cord mesenchymal stem cells and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, and the population doubling time of the two kinds of mesenchymal stem cells was reduced (umbilical cord: $P < 0.001$; menstrual blood: $P < 0.05$). (2) The lactate metabolism of the two kinds of stem cells was enhanced (umbilical cord: $P < 0.05$; menstrual blood: $P < 0.01$) under hypoxia and glucose

[1] 上海交通大学药学院，上海市 200240；[2] 上海丽坤生物科技有限公司，上海市 201400
第一作者：莫芸芳，女，1996 年生，江苏省苏州市人，汉族，上海交通大学在读硕士，主要从事间充质干细胞相关研究。
通讯作者：陈彦田，博士，助理研究员，上海交通大学药学院，上海市 200240
https://orcid.org/0000-0003-4824-5085 (莫芸芳)；https://orcid.org/0000-0002-5200-9483 (陈彦田)

基金资助：国家自然科学基金项目 (81871122)，项目负责人：王泽剑
引用本文：莫芸芳，王泽剑，齐念民，陈彦田 . 生理性低氧条件下脐带和经血来源间充质干细胞的生物学特性 [J]. 中国组织工程研究，2022，26(30):4819-4825.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

metabolism of umbilical cord mesenchymal stem cells was enhanced (P < 0.001). (3) Hypoxia improved senescence of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells under high generation. (4) Hypoxia promoted the adhesion efficiency of umbilical cord mesenchymal stem cells and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (P < 0.01). (5) Hypoxia had no effect on the stemness. (6) The results indicated that physiological hypoxia improved the proliferation and attachment efficiency of umbilical cord mesenchymal stem cells and menstrual blood derived mesenchymal stem cells and had an anti-aging effect on senescent cells, simultaneously had no effects on surface markers. In addition, hypoxia displayed different effects on the differentiation of mesenchymal stem cells derived from different sources.

Key words: stem cells; mesenchymal stem cells; physiological hypoxia; biological characteristics; proliferation; senescence; metabolism; differentiation

Funding: *the National Natural Science Foundation of China, No. 81871122 (to WZJ)*

How to cite this article: *MO YF, WANG ZJ, QI NM, CHEN YT. Biological characteristics of umbilical cord and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells under physiological hypoxia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(30):4819-4825.*

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一类来源于机体成熟组织中的多能成体干细胞，骨膜、脂肪、真皮、经血、胎肺、胎肝、胎肾、胎儿骨髓、羊水、脐带和胎盘中均存在间充质干细胞[1]，其中脐带间充质干细胞来源丰富[2]，经血源性间充质干细胞取材对捐献者没有身体损伤，并且可从同一捐献者身上多次取用[3]，这两种间充质干细胞在细胞治疗上都具有极大的前景[4-7]。

间充质干细胞在实际应用中面临着一些问题，主要是临床应用需要大量细胞支持，现阶段的细胞培养方法难以满足应用需求[8]；同时间充质干细胞还存在着容易衰老的问题[9]，所以需要对培养条件进行优化。传统的干细胞体外培养时，氧气体积分数通常保持在 20% 左右，低氧预处理常用的氧体积分数在 1%−5%[10-11]，正常人体的氧体积分数为 5% 左右[12]，多种器官及组织内氧分压通常低于外界大气压，器官和组织内的适度低氧环境被称为“生理性低氧”[13-14]，所以，相对于传统的常氧而言，生理性低氧培养更加贴近细胞在体内的生长状态，有望改善细胞的生物学特性。课题组预期探究间充质干细胞处于与体内氧体积分数相符的培养条件能否改善其生物学特性，选择 5% 氧体积分数作为培养条件。

前期已经探究了脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞在不同代数下生物学特性上的差异点和类似点[15]，研究发现两种细胞在 8 d 内都能稳定生长，但是经血源性间充质干细胞的生长速率小于脐带间充质干细胞，同时还发现脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞在培养至第 10 代时均会出现一定的衰老现象，但经血源性间充质干细胞的衰老细胞数量大于脐带间充质干细胞，前期研究并未针对这些问题进行细胞培养上的优化，故作者猜想低氧能否优化两种间充质干细胞的生物学特性，特别是经血源性间充质干细胞。该实验使用体积分数为 5% 氧气处理脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞，探究相同的指标，为干细胞培养优化提供具体信息。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验，细胞功能数据组间比较使用独立样本 t 检验和单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 3−12 月在上海交通大学药学院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 人源脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞由上海丽坤科技有限公司惠赠。

1.3.2 实验试剂 α-MEM 培养基、TrypLE(美国 Gibco 公司)；胎牛血清 (美国 Thermo 公司)；40 g/L 多聚甲醛 (上海生工)；葡萄糖检测试剂盒、乳酸检测试剂盒 (南京建成)；细胞衰老检测试剂盒 (上海碧云天)；细胞凋亡试剂盒 (美国 SAB 公司)；鼠抗人 CD14-PE、CD34-PE、CD45-PE、HLA-DR-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-APC、PE 同型小鼠 IgG1、APC 同型小鼠 IgG1(美国 BD 公司)。

1.3.3 实验仪器 二氧化碳培养箱、三气培养箱 (美国 Thermo 公司)；倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)；流式细胞仪 (美国 BD 公司)；countstar 细胞计数仪 (上海睿钰公司)。

1.4 方法

1.4.1 间充质干细胞分离与培养

脐带间充质干细胞：原代细胞分离和培养在上海丽坤科技有限公司完成，使用组织块贴壁法，剥离脐静脉内膜，去除血管剪成 2.0 mm^3 小块，将组织块按适当密度接种于培养板，加入含有体积分数为 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基培养，每隔 2 d 补加培养基。倒置显微镜下观察，当组织块周围出现成纤维状细胞后，去除组织块，更换培养基继续培养。当细胞融合度达到 80% 时，消化细胞接种至 6 孔板得原代脐带间充质干细胞。

经血源性间充质干细胞：原代细胞分离和培养在上海丽坤科技有限公司完成，使用密度梯度离心法，取经血样品 5 mL，与 5 mL PBS、0.2 mL 两性霉素 B、0.2 mL 链霉素、0.1 mL EDTA-Na 混合均匀后，4 ℃ 静置 24 h，随后 1 500 r/min 离心 10 min，弃上清，使用含体积分数为 15% 胎牛血清的 α-MEM 重悬细胞，1 500 r/min 再次离心 10 min，分离沉淀得到原代经血源性间充质干细胞。

人经血源性间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源：	人经血
原代培养方法	密度梯度离心法
培养基介绍：	α-MEM
添加材料：	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 双抗，1% L− 谷氨酰胺
原代培养时间：	原代培养 24 h 后全换液，之后每隔 2 d 全换液 1 次，8−10 d 可传代
细胞传代：	细胞融合度达 90% 时，用胰酶消化，按 $10^4/cm^2$ 的密度接种
细胞鉴定：	经流式细胞术，成骨、成脂诱导分化鉴定为经血源性间充质干细胞
伦理学批准：	该实验经过上海市第一人民医院伦理委员会批准

1.4.2 实验分组处理 将脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞各自分为常氧组和低氧组，低氧组使用三气培养箱，向其中充入氮气，使氧分压达到 5% 水平，各自培养一段时间后，对各项指标进行检测。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人脐带间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源：	人脐带
原代培养方法	组织块贴壁法
培养基介绍：	α-MEM
添加材料：	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 双抗，1% L- 谷氨酰胺
原代培养时间：	原代培养每隔 2 d 半换液 1 次，培养 12−15 d 可传代
细胞传代：	细胞融合度达 90% 时，用胰酶消化，按 10^4/cm^2 的密度接种
细胞鉴定：	经流式细胞术，成骨、成脂诱导分化鉴定为脐带间充质干细胞
伦理学批准：	该实验经过上海市第一人民医院伦理委员会批准

1.4.3 表面标志物检测 取第 5 代脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞，在不同氧体积分数下培养 5 d，消化后以 300×*g* 离心 5 min，含体积分数为 2% 胎牛血清的 PBS 清洗，向细胞中加入 CD14-PE、CD34-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-APC、HLA-DR-PE 抗体，与 IgG1 抗体结合的细胞作为同型对照，置于 4 ℃冰箱避光孵育 30 min，孵育结束后 PBS 清洗 2 次，洗去未结合的抗体，流式细胞仪检测细胞表面标志物表达量。

1.4.4 细胞贴壁效率 取生长良好的第 5 代脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞，消化后按照 1×10^3/ 孔的密度接种到 6 孔板，分别进行常氧和低氧培养，大约 2 周后显微镜可观察到集落形成，弃去培养基，PBS 冲洗细胞后使用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min，再加入 0.1% 结晶紫染色 10 min，拍照记录。

1.4.5 增殖能力检测 取第 5 代脐带和经血来源间充质干细胞，当融合度达到 80% 之后，胰酶消化，以 1×10^4/ 孔的密度接种到 24 孔板，分别进行常氧和低氧培养，每隔 2 d 进行全换液，24 h 后各取 3 孔细胞消化、细胞计数仪计数，1−8 d 内每天重复消化细胞和计数步骤，绘制生长曲线，计算群体倍增时间。

$$\text{群体倍增时间} = \text{增殖时间} \times \frac{\lg 2}{\lg(\text{收获细胞个数} / \text{接种细胞数量})}$$

1.4.6 细胞凋亡检测 取生长良好的第 6 代脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞，在不同氧体积分数下培养 5 d，胰酶消化，冷 PBS 清洗 2 遍，每管收集 5×10^5 细胞，加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后避光，4 ℃孵育 15 min，然后加入 10 μL Propidium Iodide 混匀后避光，4 ℃孵育 5 min，流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4.7 细胞衰老检测 取第 9 代脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞在常氧条件下培养至细胞融合度达 80%，胰酶消化，以 1×10^4/cm^2 密度接种于 24 孔板，在不同氧体积分数下培养 5 d，使用 β- 半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老情况，吸去 24 孔板中的细胞培养液，PBS 洗涤 1 次，加入 250 μL β- 半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 min，吸除细胞固定液，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 250 μL 染色工作液，37 ℃孵育过夜，观察记录实验结果。使用软件 Image J 对染色部分进行定量统计。

1.4.8 细胞葡萄糖乳酸代谢检测 生长良好的第 5 代脐带间充质干细胞和经血来源间充质干细胞，按照 1×10^4/cm^2 接种至 24 孔板中，分别进行常氧和低氧培养，在第 2，5，8 天各取 3 孔的培养基上清，使用葡萄糖检测试剂盒、乳酸检测试剂盒测定上清中葡萄糖和乳酸水平。

1.4.9 干细胞分化能力检测

成骨分化：使用成骨诱导分化培养基试剂盒，参考说明书完成成骨诱导分化完全培养基的配制。当第 5 代脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞融合度达到 80% 时，消化细胞，按照 2×10^4/cm^2 的细胞密度接种到事先包被明胶的 6 孔板中，分别进行常氧和低氧培养，当细胞融合度达到 70% 后，两组细胞均置于常氧培养箱中，实验组更换成骨诱导培养基，对照组更换基础培养基，每间隔 2 d 换液 1 次。诱导 3 周后，用茜素红染色观察钙结节沉积。细胞经茜素红染色后，每孔加入 10% 氯化十六烷基吡啶溶液，室温脱色 10 min，酶标仪测定 570 nm 处吸光度值。

成脂分化：使用成脂诱导分化培养基试剂盒，参考说明书完成成脂诱导分化完全培养基的配制。当第 5 代脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞融合度达到 80% 时，消化细胞，按照 2×10^4/cm^2 的细胞密度接种到 6 孔板中，分别进行常氧和低氧培养，当细胞融合度达到 100% 后，两组细胞均置于常氧培养箱中，实验组更换成脂诱导培养基，对照组更换基础培养基，每间隔 2 d 换液 1 次。诱导 3 周后，用油红 O 染色观察油滴。细胞经油红 O 染色后，每孔加入异丙醇溶液，室温脱色 5 min，酶标仪测定 510 nm 处吸光度值。

1.5 主要观察指标 低氧组和常氧组脐带间充质干细胞、经血源性间充质干细胞的表面标志物、贴壁效率、增殖能力、细胞凋亡、细胞衰老、葡萄糖乳酸代谢和细胞分化情况。

1.6 统计学分析 实验数据使用 SPSS 23.0 软件进行分析，不同组间比较使用独立样本 *t* 检验，多组间比较使用单因素方差分析，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

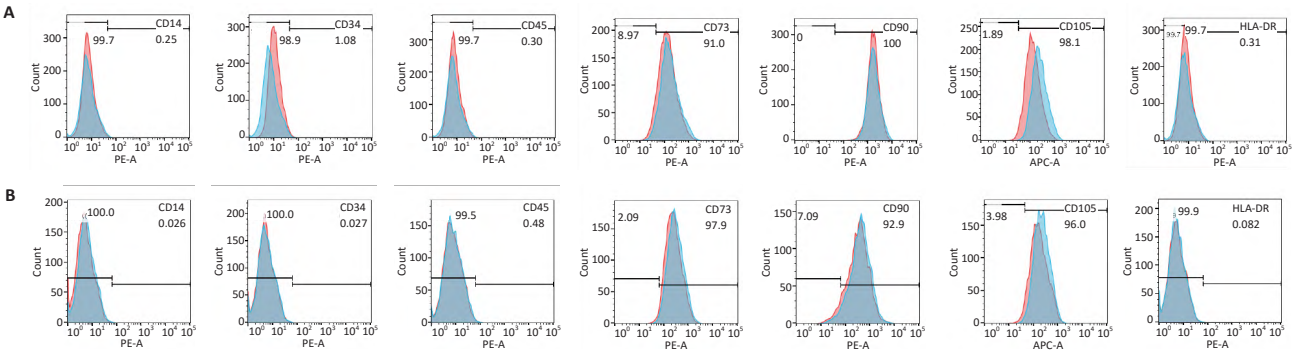
2.1 生理性低氧不影响间充质干细胞表面标志物的表达 低氧处理对脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞的免疫表型没有影响，低氧组与常氧组免疫表型表达情况相同，CD14，CD34，CD45 和 HLA-DR 均为阴性表达；CD73，CD90 和 CD105 呈阳性表达，见**图 1**，**表 1**，说明低氧处理未改变细胞“干性”，符合间充质干细胞的鉴定标准。

表 1 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞表面标志物表达率 (%)
Table 1 | **Surface marker expression rates of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia**

细胞		CD14	CD34	CD45	CD73	CD90	CD105	HLA-DR
脐带间充质干细胞	低氧	0.25	1.08	0.30	91.00	100.00	98.10	0.31
	常氧	0.71	0.60	0.51	95.20	99.80	99.90	0.64
经血间充质干细胞	低氧	0.03	0.03	0.28	97.90	92.90	96.00	0.08
	常氧	0.14	0.10	0.48	98.90	95.50	99.00	0.09

2.2 生理性低氧优化两种间充质干细胞的贴壁效率 使用结晶紫染色后，细胞集落将呈紫色。两种细胞低氧组集落数量均多于常氧组，且差异有显著性意义 (脐带间充质干细胞：*P*=0.005；经血源性间充质干细胞：*P*=0.001)，说明低氧处理可以提高两种间充质干细胞的贴壁效率，见**表 2**。倒置相差显微镜观察集落中的细胞数量，发现低氧组细胞数量明显多于常氧组，印证了低氧可以促进两种间充质干细胞的增殖，见**图 2**。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图注：图 A 为脐带间充质干细胞表面标志物流式图；B 为经血源性间充质干细胞表面标志物流式图，图中红色代表低氧组，蓝色代表常氧组；常氧条件下，CD14、CD34、CD45 和 HLA-DR 呈阴性表达，CD73、CD90 和 CD105 呈阳性表达；低氧处理后，两种细胞的 CD14、CD34、CD45 和 HLA-DR 仍然呈阴性表达，CD73、CD90 和 CD105 仍然呈阳性表达

图 1 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的表面标志物

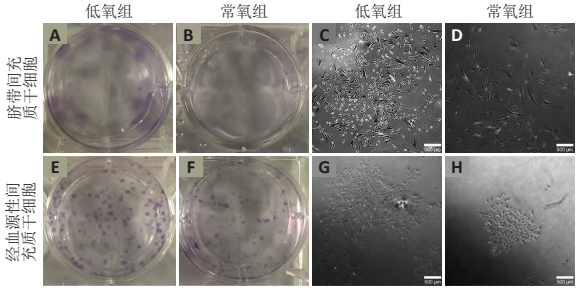
Figure 1 | Surface markers of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

表 2 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的贴壁集落数 ($\bar{x}\pm s$，n=6)

Table 2 | Colony forming unit of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

细胞	低氧	常氧
脐带间充质干细胞	13.667±4.607[a]	5.833±1.675
经血源性间充质干细胞	67.000±8.386[a]	43.333±5.467

表注：与常氧组比较，[a]P < 0.01

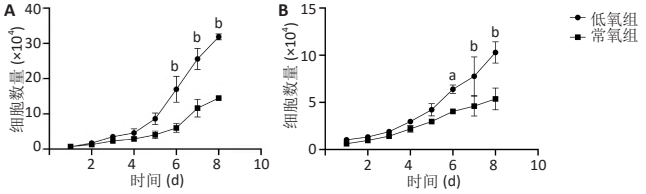


图注：图 A，B 分别为脐带间充质干细胞低氧组、常氧组结晶紫染色图；C，D 分别为脐带间充质干细胞低氧组、常氧组细胞集落图；E，F 为经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组结晶紫染色图；G，H 为经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组细胞集落图

图 2 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的贴壁情况 (×50)

Figure 2 | Adherence of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia (×50)

2.3 生理性低氧促进两种间充质干细胞增殖 根据实验结果绘制生长曲线，见**图 3**，在前 4 d，细胞生长处于潜伏期的时候，低氧对细胞增殖无明显影响，第 5 天开始，细胞生长进入对数生长期，常氧组和低氧组细胞数量开始出现差距，第 6 天，两组之间出现显著性差异 (脐带间充质干细胞：P < 0.001；经血源性间充质干细胞：P < 0.01)，一直持续到第 8 天 (脐带间充质干细胞：P < 0.001；经血源性间充质干细胞：P < 0.001)，说明生理性低氧对两种间充质干细胞的生长均有促进作用。由**表 3** 可得，两种间充质干细胞经低氧处理后，低氧组的群体倍增时间均显著小于常氧组，说明生理性低氧可以促进两种细胞增殖。此外，低氧处理后，脐带间充质干细胞群体倍增时间的缩减率约为 23%，而经血源性间充质干细胞约为 28%，说明相对于脐带间充质干细胞，低氧对经血源性间充质干细胞的群体倍增时间影响更大，对其促增殖作用更强。



图注：图 A 为脐带间充质干细胞生长曲线；B 为经血源性间充质干细胞生长曲线。与常氧组比较，[a]P < 0.01，[b]P < 0.001

图 3 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的生长曲线

Figure 3 | Growth curves of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

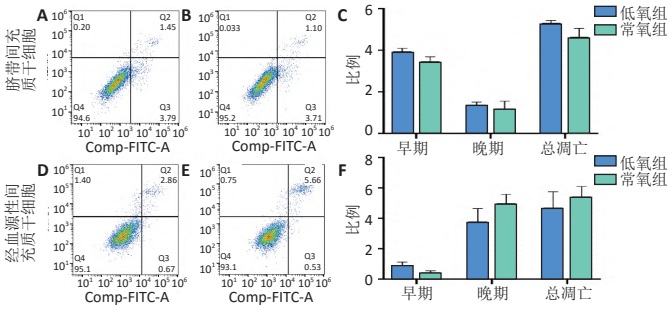
表 3 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的群体倍增时间 ($\bar{x}\pm s$，n=3，d)

Table 3 | Population doubling time of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

细胞	低氧	常氧
脐带间充质干细胞	1.602±0.010[b]	2.075±0.030
经血源性间充质干细胞	2.378±0.098[a]	3.300±0.373

表注：与常氧组比较，[a]P < 0.05，[b]P < 0.001

2.4 生理性低氧对细胞凋亡的影响 Q2 代表晚期凋亡细胞，Q3 代表早期凋亡细胞，Q4 代表活细胞，见**图 4**。脐带间充质干细胞常氧组和低氧组晚期凋亡细胞和早期凋亡细胞差异无显著性意义 (P > 0.05)；经血源性间充质干细胞常氧组和低氧组凋亡率差异无显著性意义 (P > 0.05)。



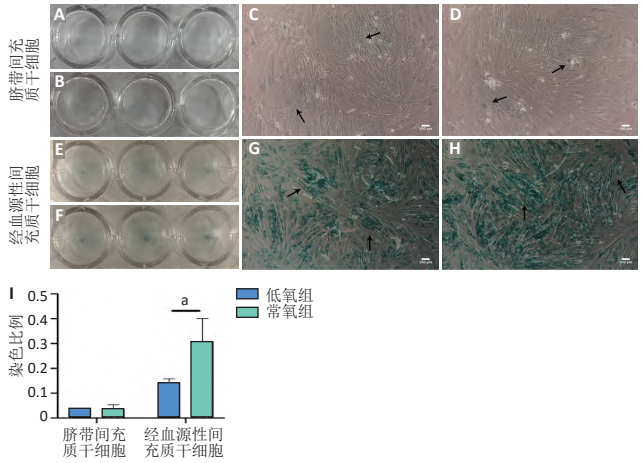
图注：图 A–C 分别为脐带间充质干细胞低氧组凋亡流式图、常氧组凋亡流式图、凋亡结果统计图；D–F 分别为经血源性间充质干细胞低氧组凋亡流式图、常氧组凋亡流式图、凋亡结果统计图；Q1 代表裸核细胞，Q2 代表晚期凋亡细胞，Q3 代表早期凋亡细胞，Q4 代表活细胞

图 4 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞的凋亡情况

Figure 4 | Apoptosis of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5 生理性低氧对经血源性间充质干细胞产生抗衰老作用 通过 β- 半乳糖苷酶染色法，衰老细胞呈蓝色。脐带间充质干细胞常氧组和低氧组衰老细胞数量均不多，两组之间无明显差异，见**图 5A–D**。经血源性间充质干细胞低氧组 24 孔板的蓝色明显浅于常氧组，见**图 5E，F**，倒置显微镜下低氧组的蓝色细胞明显少于常氧组，见**图 5G，H**，定量分析发现低氧组和常氧组染色比率存在显著性差异，见**图 5I**，说明生理性低氧对经血源性间充质干细胞能产生抗细胞衰老的作用。



图注：图 A，B 分别为脐带间充质干细胞低氧组、常氧组 24 孔板 β- 半乳糖苷酶染色；C，D 分别为倒置显微镜下脐带间充质干细胞低氧组、常氧组染色结果，箭头所示为染色的衰老细胞；E，F 为经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组 24 孔板 β- 半乳糖苷酶染色；G，H 为倒置显微镜下经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组染色结果，箭头所示为染色的衰老细胞；I 为细胞衰老染色定量分析结果，$^{a}P < 0.05$

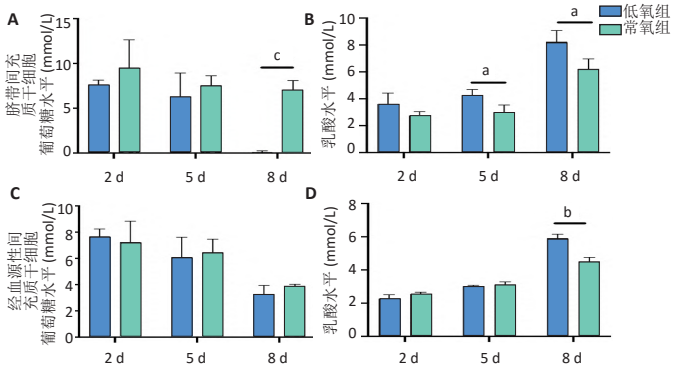
图 5 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞 β- 半乳糖苷酶染色 (×100)

Figure 5 | Results from β-galactosidase staining of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia (×100)

2.6 生理性低氧促进两种间充质干细胞代谢 由**图 6** 可见，随着培养时间增加，培养基中葡萄糖水平逐渐减少，乳酸水平逐渐增加。第 2 天时，两种细胞低氧组和常氧组的葡萄糖、乳酸水平差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。脐带间充质干细胞常氧组和低氧组葡萄糖水平第 8 天差异有显著性意义 ($P < 0.01$)，乳酸水平在第 5 天和第 8 天差异均有显著性意义 (第 5 天：$P < 0.05$；第 8 天：$P < 0.05$)，说明低氧可以促进脐带间充质干细胞代谢。经血源性间充质干细胞低氧组在第 8 天时生成更多的乳酸 ($P < 0.01$)，而常氧组和低氧组的葡萄糖水平无差别 ($P > 0.05$)。两种细胞的生长曲线在前 4 d 内低氧组和常氧组无明显差距，第 5 天开始出现差距并在第 8 天差距达到最大，两种细胞的代谢结果与生长曲线的趋势相吻合。

2.7 生理性低氧对成骨、成脂分化的影响

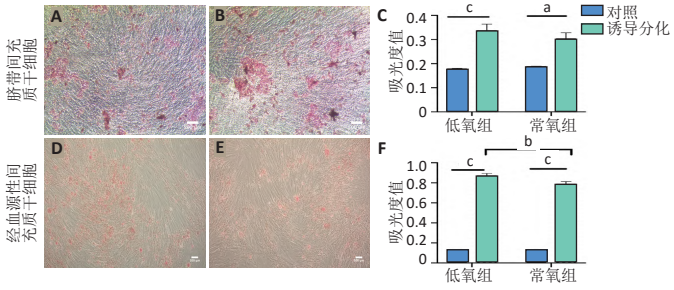
2.7.1 成骨分化 细胞成骨诱导分化后出现钙结节，钙结节经茜素红染色呈红色。脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞添加成骨分化培养基诱导之后，茜素红染色均可见明显的钙结节沉积，见**图 7**。成骨分化半定量分析结果显示，未诱导对照组和诱导分化组的吸光度值差异有显著性意义，说明两种间充质干细胞均成功诱导分化为成骨细胞，见图 7C，F。经血源性间充质干细胞低氧组的吸光度值高于常氧组 ($P < 0.01$)，说明低氧可以提高经血源性间充质干细胞的成骨分化能力。



图注：图 A，B 分别为脐带间充质干细胞培养基中葡萄糖、乳酸水平；C，D 分别为经血源性间充质干细胞培养基中葡萄糖、乳酸水平。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$

图 6 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞培养基中葡萄糖、乳酸水平

Figure 6 | Glucose and lactate concentrations of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia

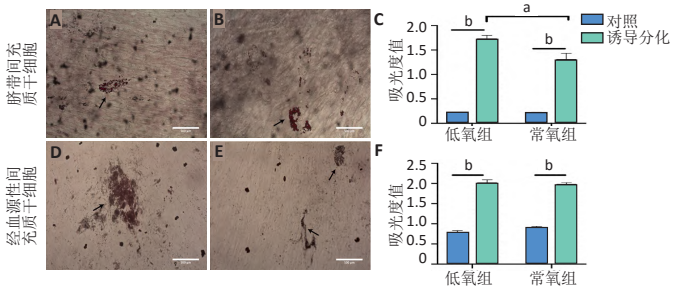


图注：图中 A，B 分别为脐带间充质干细胞低氧组、常氧组成骨分化茜素红染色；C 为脐带间充质干细胞成骨分化半定量分析结果；D，E 分别为经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组成骨分化茜素红染色；F 为经血源性间充质干细胞成骨分化半定量分析结果。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$

图 7 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞成骨分化茜素红染色 (×100)

Figure 7 | Alizarin red staining of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia (×100)

2.7.2 成脂分化 成脂诱导分化后细胞出现油滴，经油红 O 染色呈红色。脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞添加成脂诱导培养基培养后，可见红色油滴形成，见**图 8**，成脂分化半定量分析结果显示未诱导对照组和诱导分化组的吸光度值差异有显著性意义，说明脐带间充质干细胞和经血源性间充质干细胞均成功诱导分化为成脂细胞，见图 8C，F。根据半定量分析结果，脐带间充质干细胞低氧组和常氧组吸光度值差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，说明生理性低氧可以增强脐带间充质干细胞的成脂分化能力。



图注：图 A，B 分别为脐带间充质干细胞低氧组、常氧组成脂分化油红 O 染色，箭头所示为染色的油滴；C 为脐带间充质干细胞成脂分化半定量分析结果；D，E 分别为经血源性间充质干细胞低氧组、常氧组成脂分化油红 O 染色，箭头所示为染色的油滴；F 为经血源性间充质干细胞成脂分化半定量分析结果。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.001$

图 8 | 低氧和常氧条件下两种间充质干细胞成脂分化油红 O 染色 (×400)

Figure 8 | Oil red O staining of two kinds of mesenchymal stem cells under hypoxia and normoxia (×400)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论 Discussion

间充质干细胞因其良好的分化潜能、丰富的获取来源、可操作的体外培养方法，在再生医学上具有巨大的潜能[16]。脐带间充质干细胞具有成本低、侵入性小、分离方便和免疫原性低等优点[17]。在2008年，PATEL等[18]从女性经血样品中分离得到了间充质干细胞，将其命名为经血源性间充质干细胞。经血源性间充质干细胞取材方式无侵入性，对捐献者无损伤，并且可以从同一捐献者身上多次取材，是一种理想的种子细胞。

传统的干细胞体外培养时，氧气体积分数通常保持在20%左右，但是正常人体的氧体积分数仅为5%左右[12]，所以5%氧体积分数的生理性低氧可能更符合间充质干细胞的生长需求。

研究发现低氧预处理可以改善人羊膜间充质干细胞的生物学特性[19]，促进骨髓间充质干细胞对血管内皮迁移和成管[20]。有研究证实胰岛素样生长因子1过表达的骨髓间充质干细胞在低氧条件下具有更高的增殖速率，并且可以修复缺氧诱导的凋亡心肌细胞[21]。另有研究证实了5%的低氧可以促进脂肪间充质干细胞的增殖和集落形成，并促进了碱性成纤维细胞因子和血管内皮生长因子的分泌[22]。还有研究表明在5%氧体积分数的生理性低氧条件下，共培养的人脐带血管周细胞和脐带静脉内皮细胞体系中，人脐带血管周细胞增殖能力变强[23]。但是目前尚未有研究探究低氧对经血源性间充质干细胞的影响，也很少有研究比较低氧对不同来源间充质干细胞生物学特性的影响是否存在差异。

治疗组织损伤需要大量间充质干细胞的植入[24]，但是现阶段间充质干细胞存在种子细胞数量不足，容易衰老的问题，在应用上受到了一定的限制[25]。此次研究证实了低氧可以促进脐带和经血来源间充质干细胞的增殖，还能促进两种间充质干细胞集落形成，但是不改变其“干性”，CD14、CD34、CD45和HLA-DR仍然呈阴性表达，同时低氧处理后CD73、CD90和CD105依旧呈阳性表达。生理性低氧预处理提高两种间充质干细胞的贴壁效率，在培养过程中确保有更多的细胞可以贴壁生长，预示着生理性低氧处理可以扩大细胞的产量，缓解因数量不足带来的限制。研究还证实了低氧处理可以减缓经血源性间充质干细胞的衰老。CASCIARO等[26]研究发现低氧(体积分数1%)可以延缓易衰竭的人羊水干细胞衰老相关基因的表达。研究发现，经血源性间充质干细胞在临床应用上具有巨大的潜能[27]，如对子宫内膜异位症和糖尿病等疾病的治疗[7]，研究团队现阶段也发现经血源性间充质干细胞具有分化成胰岛细胞的可能性，在治疗糖尿病方面具有巨大的研究前景。但是，研究团队前期研究证实，随着代数的增加，经血源性间充质干细胞中β−半乳糖苷酶阳性细胞明显增加，第10代衰老细胞数量明显大于脐带间充质干细胞[15]，这种易衰老的问题在一定程度上限制了经血源性间充质干细胞的应用，但是少有探索改善经血源性间充质干细胞衰老的研究。此次研究发现低氧处理可以作为抗经血源性间充质干细胞老化的优化培养方法，对扩大经血源性间充质干细胞的应用具有重大的意义。在代谢方面，生理性低氧处理后，脐带和经血来源间充质干细胞的乳酸水平均发生了显著性变化。FLORES等[28]发现乳酸脱氢酶可以激活毛囊干细胞，乳酸在激活毛囊干细胞增殖过程中发挥了重要的作用。YE等[29]则证实乳酸脱氢酶在低氧促进毛乳头细胞增殖过程中发挥了作用，从而推测乳酸脱氢酶可能有望成为治疗脱发的新靶点，这也提示生理性低氧促进脐带间充质干细胞和经血来源间充质细胞增殖的机制可能与乳酸脱氢酶表达量增加、乳酸生成量上升有关。现有研究证实了生理性低氧可以促进代谢，为后期探究代谢机制在低氧改变间充质干细胞生物学特性过程中是否发挥作用提供了表型上的支持，也有望在此过程中发现一些可能的作用靶标。

尽管两种间充质干细胞处在相同代数下，经过了相同的处理时间，但是两种细胞的生物学特性变化并不完全相同。半定量分析结果显示生理性低氧促进经血源性间充质干细胞成骨分化，促进脐带间充质干细胞成脂分化，但是对于脐带间充质干细胞成骨分化和经血源性间充质干细胞成脂分化不存在显著性影响。有研究显示体积分数为3%氧气会抑制骨髓间充质干细胞成脂、成骨分化能力[30]。也有研究显示体积分数为2%低氧培养骨髓间充质干细胞2周后对细胞进行诱导分化，低氧条件下细胞表达成骨分化关键基因RUNX2显著高于常氧组，但是表达的成脂分化关键基因PPARg则显著低于常氧组，认为低氧促进间充质干细胞成骨分化而抑制成脂分化[31]。在低氧影响脂肪间充质干细胞成脂分化的研究中发现，当氧体积分数为2%时可以促进细胞成脂分化，但是当氧体积分数调整至5%时，对脂肪间充质干细胞成脂分化能力无显著性影响[32]，说明不同氧体积分数对不同来源间充质干细胞生物学特性的影响可能是不同的。此次研究平行记录生理性低氧对两种来源间充质干细胞生物学特性的影响，研究发现虽然是相同的氧体积分数，但是两种细胞在衰老和分化等特征上的改变并不相同，这些数据为后期优化不同来源间充质干细胞的不同生物学特征的条件选择奠定了基础。

实验结果显示生理性低氧对减缓细胞凋亡的效果并不明显，有研究证实体积分数为5%低氧预处理与姜黄素联合作用可以显著提高骨髓间充质干细胞存活率，抑制caspase-3活化，并改善其线粒体功能，该过程与PCG-1α/SIRT3/HIF-1α信号通路有关[33]，这提示将生理性低氧与外源抗氧化剂相结合可能进一步改善间充质干细胞的生物学特性，特别是在细胞凋亡和氧化应激功能上可以获得进一步优化。

综上所述，体积分数为5%的生理性低氧可以促进脐带和经血来源间充质干细胞的贴壁效率、增殖和细胞代谢，同时相较于脐带间充质干细胞，低氧对经血源性间充质干细胞的增殖作用和抗衰老作用更强，对于改善经血源性间充质干细胞这种培养困难的种子细胞具有重大的意义，这也为研究团队后期探究经血源性间充质干细胞治疗糖尿病提供了稳定质量的细胞来源。

致谢：感谢上海丽坤科技有限公司对实验的支持与帮助。

作者贡献：实验设计为莫芸芳与陈彦田；实验实施为莫芸芳、王泽剑和齐念民；实验评估为齐念民和陈彦田。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金(81871122)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写的过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：该研究的实施符合上海市第一人民医院的相关伦理要求（医院伦理批件号：2013KY080）。

知情同意问题：实验所用样本来自于足月产产妇与健康女性，捐献者均签署知情同意书，符合上海市第一人民医院伦理委员会要求。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经上海交通大学药学院生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-147.
[2] WANG HS, HUNG SC, PENG ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004;22(7):1330-1337.
[3] MENG X, ICHIM TE, ZHONG J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J Transl Med. 2007;5:57.
[4] LIAU LL, RUSZYMAH BHI, NG MH, et al. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. Curr Res Transl Med. 2020;68(1):5-16.
[5] TIMANER M, TSAI KK, SHAKED Y. The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. Semin Cancer Biol. 2020;60:225-237.
[6] GARGETT CE, SCHWAB KE, DEANE JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Hum Reprod Update. 2016;22(2):137-163.
[7] CHEN L, QU J, XIANG C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):1.
[8] NORONHA NC, MIZUKAMI A, CALIÁRI-OLIVEIRA C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):131.
[9] HARADA S, MABUCHI Y, KOHYAMA J, et al. FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells. Stem Cells. 2021;39(3):318-330.
[10] 侯婧瑛，于萌蕾，郭天柱，等. 缺氧预处理激活 HIF-1α/MALAT1/VEGFA 通路促进骨髓间充质干细胞生存和血管再生 [J]. 中国组织工程研究，2021,25(7): 985-990.
[11] LEE HJ, JUNG YH, CHOI GE, et al. BNIP3 induction by hypoxia stimulates FASN-dependent free fatty acid production enhancing therapeutic potential of umbilical cord blood-derived human mesenchymal stem cells. Redox Biol. 2017;13:426-443.
[12] MOHYELDIN A, GARZÓN-MUVDI T, QUIÑONES-HINOJOSA A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell. 2010;7(2):150-161.
[13] GORNOSTAEVA AN, BOBYLEVA PI, ANDREEVA ER, et al. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia. Tissue Cell. 2020;63:101320.
[14] IVANOVIC Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J Cell Physiol. 2009;219(2):271-275.
[15] REN H, SANG Y, ZHANG F, et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. Stem Cells Int. 2016;2016:3516574.
[16] JOO HS, SUH JH, LEE HJ, et al. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. Int J Mol Sci. 2020;21(3):727.
[17] YIN S, JI C, WU P, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. Am J Transl Res. 2019;11(3):1230-1240.
[18] PATEL AN, PARK E, KUZMAN M, et al. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transplant. 2008;17(3):303-311.
[19] 代敏，王帅，张霓霓，等. 低氧预处理人羊膜间充质干细胞的生物学特征 [J]. 中国组织工程研究，2021,25(19):3004-3008.
[20] 王雅芬，苏静波，王雨生，等. 缺氧条件下骨髓间充质干细胞对血管内皮细胞迁移和管腔形成的影响 [J]. 国际眼科杂志，2020,20(1):16-20.
[21] LIN M, LIU X, ZHENG H, et al. IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway. Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):22.
[22] DENG Y, HUANG G, CHEN F, et al. Hypoxia enhances buffalo adipose-derived mesenchymal stem cells proliferation, stemness, and reprogramming into induced pluripotent stem cells. J Cell Physiol. 2019;234(10):17254-17268.
[23] XU L, WILLUMEIT-RÖMER R, LUTHRINGER-FEYERABEND B. Hypoxia influences the effects of magnesium degradation products on the interactions between endothelial and mesenchymal stem cells. Acta Biomater. 2020;101:624-636.
[24] PITTENGER MF, DISCHER DE, PÉAULT BM, et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regen Med. 2019;4:22.
[25] DRELA K, STANASZEK L, NOWAKOWSKI A, et al. Experimental Strategies of Mesenchymal Stem Cell Propagation: Adverse Events and Potential Risk of Functional Changes. Stem Cells Int. 2019;2019:7012692.
[26] CASCIARO F, BORGHESAN M, BERETTI F, et al. Prolonged hypoxia delays aging and preserves functionality of human amniotic fluid stem cells. Mech Ageing Dev. 2020;191:111328.
[27] LIU Y, NIU R, LI W, et al. Therapeutic potential of menstrual blood-derived endometrial stem cells in cardiac diseases. Cell Mol Life Sci. 2019;76(9):1681-1695.
[28] FLORES A, SCHELL J, KRALL AS, et al. Lactate dehydrogenase activity drives hair follicle stem cell activation. Nat Cell Biol. 2017;19(9):1017-1026.
[29] YE J, TANG X, LONG Y, et al. The effect of hypoxia on the proliferation capacity of dermal papilla cell by regulating lactate dehydrogenase. J Cosmet Dermatol. 2021;20(2):684-690.
[30] FEHRER C, BRUNAUER R, LASCHOBER G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell. 2007;6(6):745-757.
[31] WAGEGG M, GABER T, LOHANATHA FL, et al. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. PLoS One. 2012;7(9):e46483.
[32] KIM JH, KIM SH, SONG SY, et al. Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. Cell Biol Int. 2014;38(1):32-40.
[33] WANG X, SHEN K, WANG J, et al. Hypoxic preconditioning combined with curcumin promotes cell survival and mitochondrial quality of bone marrow mesenchymal stem cells, and accelerates cutaneous wound healing via PGC-1α/SIRT3/HIF-1α signaling. Free Radic Biol Med. 2020;159:164-176.

（责任编辑：MZH，ZN，ZH）

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net