低氧培养环境对脐带间充质干细胞增殖及生物学特性的影响

张 莉[1, 2, 3]，杨俊晔[1, 3]，房敬超[1, 3]，张 华[1, 2, 3]，徐志国[4, 5]，韩俊领[1, 3]，张 宇[1, 2, 3*]，杜 为[1, 2, 3, 6*]

1. 协和干细胞基因工程有限公司，天津 300384
2. 天津市血液细胞治疗技术企业重点实验室，天津 300384
3. 国家干细胞产品产业化基地，天津 300384
4. 湖州师范学院求真学院 生命科学与健康系，浙江 湖州 313000
5. 协和华东干细胞基因工程有限公司，浙江 湖州 313000
6. 南开大学 医学院，天津 300371

摘 要：目的 研究低氧环境对人脐带间充质干细胞（hUCMSCs）增殖及生物学特性的影响。**方法** 分别在5% O_2和21% O_2环境下培养hUCMSCs，使用群体倍增时间（PDT）评价hUCMSCs的增殖情况；流式细胞术检测细胞表面标志CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、HLA-DR的表达；培养基诱导分化后，茜素红-S对含钙骨细胞染色检测成骨诱导分化，油红O对脂滴染色检测成脂诱导分化，阿尔新蓝8GX对蛋白多糖检测软骨诱导分化；羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯（CFSE）染色法检测hUCMSCs对植物血凝素P（PHA-P）刺激的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）的增殖抑制作用，并应用流式细胞术检测对$CD8^+$ T细胞的抑制作用；实时荧光定量PCR（qRT-PCR）法检测低氧诱导因子1α（HIF-1α）、血管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）、胰岛素样生长因子2（IGF-2）、转化生长因子β（TGF-β）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、基质细胞衍生生长因子1（SDF-1）、神经生长因子（NGF）mRNA表达；试剂盒法检测细胞培养上清中IGF-2浓度。**结果** 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs表面标志CD73、CD90、CD105的表达均为阳性（＞95%），CD34、CD45、HLA-DR的表达均为阴性（＜2%），均具有成骨、成脂、成软骨三系分化的能力；5% O_2组的PDT均显著小于21% O_2组（P＜0.05）；PBMC经PHA-P刺激后观察到细胞增殖聚集，与hUCMSCs共培养后几乎没有聚集出现，与PBMC＋PHA-P组比较，PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（21%或5% O_2）组子代细胞明显减少，PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（5% O_2）组PBMC抑制率为（61.44±0.92）%，与PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（21% O_2）抑制率（60.48±4.00）%相当，无统计学差异，且两组hUCMSCs对$CD8^+$ T细胞的抑制作用无统计学差异。与21% O_2组比较，5% O_2组hUCMSCs HIF-1α、IGF-2、SDF-1、HGF、VEGF、bFGF、NGF mRNA表达水平显著升高（P＜0.05、0.001），TGF-β无明显变化；5% O_2组hUCMSCs培养上清IGF-2水平显著高于21% O_2组（P＜0.001）。**结论** 5% O_2环境可使hUCMSCs的增殖能力和相关生长因子的表达增强，尤其是IGF-2，但依然保持着与21% O_2环境培养的hUCMSCs相似的表型、分化能力以及淋巴细胞增殖抑制能力。

关键词：脐带间充质干细胞；低氧；增殖；生长因子

中图分类号：R329.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1674-6376（2022）05-0886-09

DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.010

Effects of hypoxia on proliferation and biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells

ZHANG Li[1, 2, 3], YANG Junye[1, 3], FANG Jingchao[1, 3], ZHANG Hua[1, 2, 3], XU Zhiguo[4, 5], HAN Junling[1, 3], ZHANG Yu[1, 2, 3], DU Wei[1, 2, 3, 6]

1. Union Stem Cell&Gene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China
2. Tianjin Enterprises Key Laboratory of Blood Cell Therapy Technology, Tianjin 300384, China
3. National Stem Cell Product Industrialization Base, Tianjin 300384, China
4. Huzhou College, Huzhou 313000, China
5. Eastern Union Stem Cell & Gene Engineering Co., Ltd., Huzhou 313000, China
6. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

收稿日期：2021-09-28

基金项目：天津市科技计划创新平台专项（18PTSYJC00070）；天津市博士后择优资助计划项目（TJQYBSH2018030）

第一作者：张 莉（1997—），女，本科，研究方向为干细胞培养工艺。Tel：13502110792 E-mail：zhanglixh@vcanbio.com

***共同通信作者：**张 宇（1984—），男，博士，研究方向为干细胞及免疫细胞产品开发。Tel：（022）83715125 E-mail：zhangyu@vcanbio.com

杜 为（1980—），男，博士，研究方向为脐带血及干细胞的存储和应用开发。Tel：（022）83715125 E-mail：duweixhgxb@vcanbio.com

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Abstract: Objective To study the effects of hypoxia on proliferation and growth factor secretion of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs). **Methods** hUCMSCs were cultured at 5% O_2 and 21% O_2, respectively, and the proliferation of hUCMSCs was evaluated by population doubling time (PDT). The expression of CD73, CD90, CD105, CD34, CD45 and HLA-DR were detected by flow cytometry. After medium induced differentiation, alizarin red-S was used to detect osteoblast induced differentiation, oil red O was used to detect lipid-induced differentiation, alsinblue 8GX was used to detect cartilage induced differentiation. The inhibitory effect of hUCMSCs on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by PHA-P was determined by CFSE staining. Flow cytometry was used to detect the inhibition of $CD8^+$ T cells. Real-time fluorescence quantitative PCR (QRT-PCR) was used to detect HIF-1 α, vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor 2 (IGF-2), transforming growth factor β (TGF-β), basic fibroblast growth factor (bFGF) and stromal cells Expression of SDF-1 and NGF mRNA; The concentration of IGF-2 in cell culture supernatant was detected by kit method. **Results** The expression of CD73, CD90, and CD105 was positive (> 95%), and the expression of CD34, CD45, and HLA-DR was negative (< 2%). HUCMSCs cultured in 21% O_2 and 5% O_2 environment had the ability of osteogenic, lipid-forming, and chondrogenic differentiation. The PDT in 5% O_2 group was significantly lower than that in 21% O_2 group ($P < 0.05$). Cell proliferation and aggregation were observed after PHA-P stimulation of PBMC, and almost no aggregation was observed after co-culture with hUCMSCs. Compared with PBMC+PHA-P group, the progeny cells of PBMC+PHA-P+hUCMSCs (21% or 5% O_2) were significantly reduced. The PBMC inhibition rate of PBMC+PHA-P+hUCMSCs (5% O_2) group was (61.44±0.92) %, which was similar to that of PBMC+PHA-P+hUCMSCs (21% O_2) (60.48±4.00) %, with no statistical difference. There was no statistical difference in the inhibitory effect of hUCMSCs on $CD8^+$ T cells between the two groups. Compared with 21% O_2 group, mRNA expression levels of hUCMSCs HIF-1α, IGF-2, SDF-1, HGF, VEGF, bFGF and NGF in 5% O_2 group were significantly increased ($P < 0.05$, 0.001), while TGF-β had no significant change. The IGF-2 level in the supernatant of hUCMSCs cultured in 5% O_2 group was significantly higher than that in 21% O_2 group ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of related growth factors, especially IGF-2, and proliferation ability of hUCMSCs are enhanced when hUCMSCs are cultured in 5% O_2, but the phenotype, differentiation ability and lymphocytes proliferation inhibition ability of hUCMSCs are still similar to those cultured in 21% O_2.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cells; hypoxia; proliferation; growth factors

人脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cells，hUCMSCs）是从脐带沃顿胶（Wharton's jelly，WJ）中分离出的一群多潜能间充质基质细胞。与成人组织来源的间充质干细胞（MSCs）相比，具有更低的免疫原性、更高的增殖和自我更新能力[1]。同时，hUCMSCs具有来源广泛、无伦理争议、取材时对供者无伤害的优势，研究者广泛将其作为种子细胞应用于组织工程和再生医学的研究[2]。目前，hUCMSCs已经被应用到神经系统疾病、心血管系统疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病、糖尿病、肌肉变性病、肝脏疾病及慢性疼痛等的临床研究中，具有广阔的应用及开发前景[3]。

临床研究及应用的hUCMSCs需要体外培养和扩增，不同培养环境会影响hUCMSCs的特性，如免疫调节功能、活性因子分泌水平以及细胞分化能力等。如何针对hUCMSCs的应用方向选择合适的培养环境，从而产生更有益于临床的细胞，是目前亟需解决的问题。目前hUCMSCs在体外培养通常是在环境常氧（21% O_2）中进行，但实际上hUCMSCs的生理微环境中的O_2浓度要低得多[1]。在体内，组织的O_2水平被维持在一个称为“生理常氧”的较小范围内，通常是2%～9%[3]。

本研究选择“生理常氧”的中间值5% O_2环境作为低氧培养环境，探究长期低氧培养对hUCMSCs增殖和其生物学特性的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

脐带来源于足月分娩的胎儿，脐带供者知情同意，经中国医学科学院血液病医院伦理委员会批准（批件号IIT-SC2022007-EC-2），符合伦理要求。外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）分离自富含血小板白膜，富含血小板白膜由天津市血液中心制备并提供。

DMEM/F12培养基（批号0044119）、胎牛血清（FBS，批号1818398）、成骨分化培养基（批号1934858）、成脂分化培养基（批号1937908）、成软骨分化培养基（批号1935881），购自Biological Industriers；表皮生长因子（EGF，PeproTech，批号0818AFC05）；TrypLE消化液（Gibco，批号2080691）；CCK-8（Solarbio，批号1016H012）；CD73-PE（批号9010996）、CD90-PE（批号9035835）、CD105-PE（批号8289645）、CD34-FITC（批号

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

9315123）、CD45-FITC（批号 9149795）、HLA-DR-FITC（批号 0183262）、PE Mouse IgG1，κ Isotype Control（批号 9217868）、FITC Mouse IgG2a，κ Isotype Control（批号 0217804）、羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯（CFSE，批号 8316709）、$CD3^+$/$CD8^+$/CD45/$CD4^+$抗体，购自美国 BD 公司；茜素红-S（批号 SHBL6801）、油红 O（批号 MKCJ3586）、阿尔新蓝 8GX（批号 SHBL2689），购自 Sigma-Aldrich 公司；植物血凝素 P（PHA-P，Sigma，批号 SLBT1570）；TRIzol（Invitrogen，批号 229009）；RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Thermo Fisher Scientific，批号 00762347）；EvaGreen Supermix（BIO-RAD，批号 64289331）；引物（天津擎科生物科技有限公司）；胰岛素样生长因子 2（IGF-2）检测试剂盒（Bio Vision）。

1.2 主要仪器

生物安全柜，HF safe-1200LC A2，Heal Force（上海力申科学仪器有限公司）；legend rt 台式高速冷冻离心机、3111 二氧化碳培养箱、3131 三气培养箱，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；CKX41 倒置显微镜，日本 OLYMPUS 公司；DigiRetina 16 显微相机（上海赫普化医药技术有限公司）；FACS Calibur 流式分析仪，美国 BD 公司；Nanodrop 2000 超微量分光光度计，美国 Nanodrop 公司；PCR 仪，PCR System 9700，美国 ABI GeneAmp 公司；LightCycler®96 QPCR 仪，瑞士 Roche 公司；MULTISKAN FC 酶标仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法

2.1 分离和培养

将脐带剪成 2 mm^3 小块，均匀接种于 T75 培养瓶中，加入 10 mL 培养基分别放入 21% O_2、5% CO_2、37 ℃的二氧化碳培养箱和 5% O_2、5% CO_2、37 ℃的三气培养箱中培养，之后所有的培养都在相应的培养箱中进行。原代（P_0）～第 2 代（P_2）培养使用含 20% FBS 并添加 10 μg·mL^{-1} EGF 的 DMEM/F12 培养基，P_3及之后的培养基 FBS 含量为 10%，所有培养基均不添加抗生素。当细胞密度达到 80%～90% 时，使用 TrypLE 消化液消化计数传代，传代密度均为 8 000·cm^{-2}。

2.2 细胞增殖实验

使用群体倍增时间（population doubling time，PDT）评价 hUCMSCs 冻存前 P_2 和复苏后 P_3、P_5 的增殖情况。按 8 000·cm^{-2} 的密度接种，绘制细胞增殖曲线，取增殖曲线平台期的第一个点的培养时间和获得细胞数，计算 PDT。其中细胞数使用细胞计数板进行计数。

细胞数＝（4 个大格细胞总数×10^4/4）×体积×稀释倍数

$$PDT = t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$$

t 表示细胞增殖达到平台期的培养时间；N_t 表示细胞增殖达到平台期时获得的细胞数；N_0 表示初始接种细胞数

2.3 表面标志检测

将 21% O_2 和 5% O_2 环境培养的 hUCMSCs P_5 细胞消化，300×g 离心 6 min，加入 2 mL 1×PBS 重悬，分别用鼠抗人的 CD73-PE/CD90-PE/CD105-PE（以鼠 IgG1 抗体为同型对照）和鼠抗人 CD34-FITC/CD45-FITC/HLA-DR-FITC 抗体（以鼠 IgG2a 抗体为同型对照）标记，流式分析仪检测。

2.4 诱导分化及染色

消化 21% O_2 和 5% O_2 环境培养的 hUCMSCs P_4 的细胞，按一定的细胞密度铺入 24 孔板中，各铺 3 个孔。成骨/成脂诱导分化均以 3×10^4·cm^{-2} 的密度将细胞铺在 24 孔板中，成软骨诱导分化细胞铺板密度减半。用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养 24 h 后，分别更换成骨、成脂、成软骨分化培养基。每 3 天换液 1 次，诱导培养 21 d 后，使用茜素红-S 对含钙骨细胞染色检测成骨诱导分化，油红 O 对脂滴染色检测成脂诱导分化，阿尔新蓝 8GX 对蛋白多糖检测软骨诱导分化。

2.5 抑制淋巴细胞增殖试验

消化 21% O_2 和 5% O_2 环境培养的 hUCMSCs 细胞，在 24 孔板中以每孔 1×10^5 接种，分别放入低氧和常氧培养箱中培养 2 h，用 10 μg·mL^{-1} 的丝裂霉素 C 去增殖处理 3 h。将新鲜分离的 PBMC 一部分用 2.5 μmol·L^{-1} 的 CFSE 在 37 ℃条件下染色 10 min，另一部分不染色。按 10∶1 的比例将 CFSE 染色的 PBMC 和未染色的 PBMC 分别与经过去增殖处理的 hUCMSCs 共培养 5 d，流式细胞仪检测。实验分为 PBMC 组、PBMC＋PHA-P 组、21% O_2 培养的 hUCMSCs 抑制组［PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（21% O_2）］、5% O_2 培养的 hUCMSCs 抑制组［PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（5% O_2）］，其中除 PBMC 组外，其余组均用 10 μg·mL^{-1} 的 PHA-P 刺激，分析子代细胞比例，计算抑制率。未经 CFSE 染色的 PBMC 与 hUCMSCs 共培养后，用 $CD3^+$/$CD8^+$/CD45/$CD4^+$抗体检测 T 细胞亚群。

抑制率＝（A－C）/A

A 表示阳性对照组 CFSE 子代细胞百分比；C 表示 PBMC＋

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PHA-P＋hUCMSCs（5%或21% O_2）CFSE子代细胞百分比

2.6 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）

消化21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs P_3和P_5细胞，用TRIzol提取细胞RNA，NanoDrop2 000测RNA浓度。用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit将RNA逆转录为cDNA，EvaGreen Supermix及引物（表1）配制反应体系，在LightCycler®96 QPCR仪上进行qRT-PCR反应。程序设置为酶激活：95 ℃、30 s，1个循环；变性：95 ℃、5 s，退火/延伸：55 ℃、20 s，40个循环。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

相关因子	基因	引物序列（5’-3’）
内参	*GAPDH*	正向：GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAG
		反向：GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGTC
低氧诱导因子1α（HIF-1α）	*HIF-1α*	正向：ATCCATGTGACCATGAGGAAATG
		反向：TCGGCTAGTTAGGGTACACTTC
血管内皮生长因子（VEGF）	*VEGF*	正向：GGGCAGAATCATCACGAAGT
		反向：GGCTTGAAGATGTACTCGATCTC
肝细胞生长因子（HGF）	*HGF*	正向：GGATCATACAGAATCAGGCAAG
		反向：GGTGTGAGGGTCAAGAGTAT
胰岛素样生长因子2（IGF-2）	*IGF-2*	正向：ACCCTCCAGTTCGTCTGT
		反向：CGGAAACAGCACTCCTCAA
转化生长因子β（TGF-β）	*TGF-β*	正向：CCTTCCCTCTGAACTCCTACAT
		反向：ATCGAAGTAGAGGACGGAGATG
碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）	*bFGF*（*FGF-2*）	正向：AGTGTGTGCTAACCGTTACCT
		反向：ACTGCCCAGTTCGTTTCAGTG
基质细胞衍生生长因子1（SDF-1）	*CXCL12*	正向：ATGCCCATGCCGATTCTT
		反向：CACACTTGTCTGTTGTTGTTCTT
神经生长因子（NGF）	*NGF*	正向：GTCATCATCCCATCCCATCTTC
		反向：TAATGTTCACCTCTCCCAACAC

2.7 培养上清IGF-2浓度检测

收集21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs P_3、P_5细胞培养上清，适当离心后收集上清，使用IGF-2试剂盒检测IGF-2浓度。

2.8 统计学方法

使用GraphPad Prism 6进行统计分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用两样本t检验。

3 结果

3.1 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs基本生物学特性

21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs CD73、CD90、CD105的表达均为阳性（＞95%），CD34、CD45、HLA-DR的表达均为阴性（＜2%）（图1-A）；均具有成骨、成脂、成软骨三系分化的能力（图1-B）。

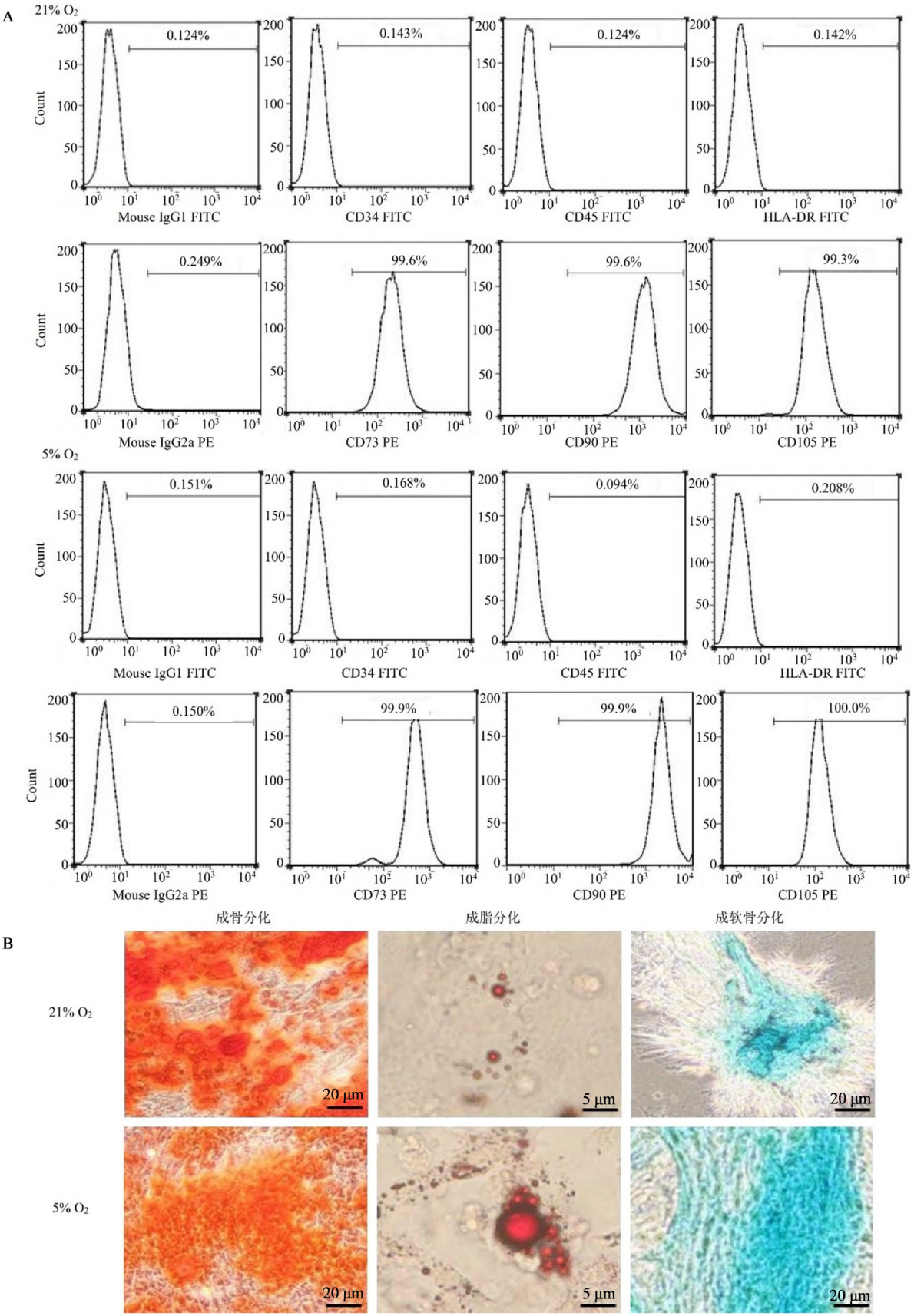
3.2 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs增殖能力

分别在21% O_2和5% O_2环境中进行hUCMSCs P_0细胞的分离，细胞从组织块中分离形成集落的过程中，5% O_2组并未显示出优势。获得P_1细胞后，以相同密度接种hUCMSCs进行后续扩增，无论是冻存前的P_2，还是复苏培养的P_3、P_5，5% O_2组的PDT均显著小于21% O_2组，且均具有统计学意义（$P<0.05$）（表2），表明5% O_2环境可以提高分离后的hUCMSCs的增殖能力。

3.3 5% O_2培养环境对hUCMSCs抑制淋巴细胞增殖能力的影响

5% O_2和21% O_2环境培养的hUCMSCs均有抑制淋巴细胞增殖的能力，PBMC经PHA-P刺激后观察到细胞增殖聚集，与hUCMSCs共培养后几乎没有聚集出现（图2-A）。流式细胞术检测CFSE的荧光强度，PBMC＋PHA-P组亲本的细胞减少，CFSE荧光强度减弱，表明在PHA-P刺激下PBMC增殖；与PBMC＋PHA-P组比较，PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（21% 或 5% O_2）子代细胞明显减少（图2-B），这与镜下观察到的结果相符。本

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A-hUCMSCs P_5表面标志表达；B-hUCMSCs P_5成骨、成脂、成软骨三系分化

A-Expression of hUCMSCs P_5 surface markers; B-hUCMSCs P_5 differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes

图1 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs基本生物学特性

Fig. 1 Basic biological characteristics of hUCMSCs cultured in 21% O_2 and 5% O_2

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs P_2、P_3、P_5 PDT（$\bar{x}\pm s$，n=3）

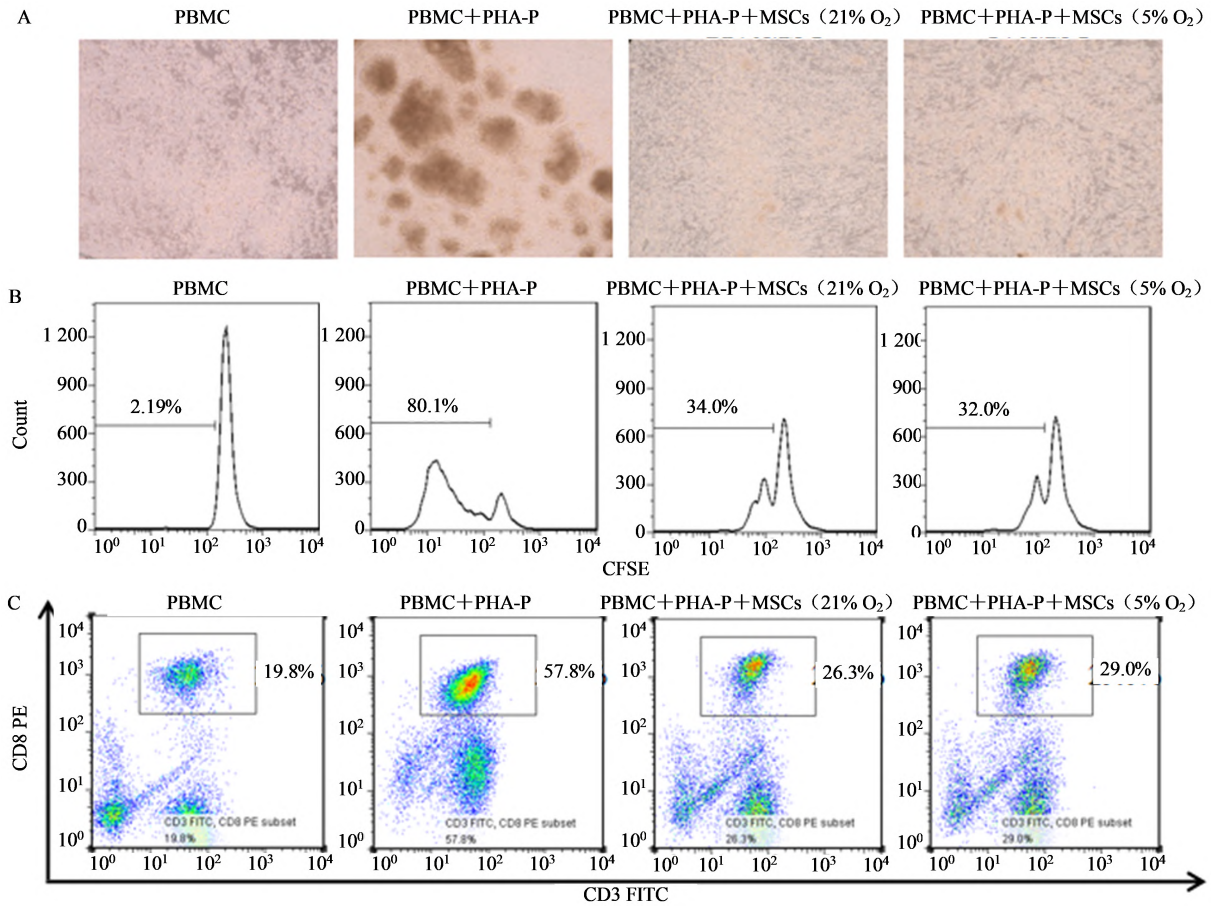
Table 2 PDT of hUCMSCs P_2, P_3, and P_5 cultured in 21% O_2 and 5% O_2 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	P_2 PDT	P_3 PDT	P_5 PDT
21% O_2	47.24±4.73	39.18±4.51	60.93±8.65
5% O_2	28.86±3.61*	29.21±1.33*	30.95±1.57*

与21% O_2组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* 21% O_2 group

实验将5% O_2环境培养的hUMSCs与PBMC分别在5%和21% O_2环境下进行实验，对PBMC的增殖抑制能力没有差别，因此在21% O_2环境下进行实验。PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（5% O_2）组PBMC抑制率为（61.44±0.92）%，与PBMC＋PHA-P＋hUCMSCs（21% O_2）抑制率（60.48±4.00）%相当，无统计学差异；分析两组hUCMSCs对细胞毒性T细胞（$CD8^+$ T细胞）的抑制作用，发现其抑制率均达到70%以上，且无统计学差异。结果见表3。



A-PBMC细胞形态；B-hUCMSCs抑制PBMC增殖的流式直方图；C-PBMC与hUCMSCs共培养，$CD8^+$ T增殖流式图

A-Morphology of PBMC; B-Flow cytometric histogram of inhibition of PBMC proliferation by hUCMSCs; C-PBMCs and hUCMSCs co-cultured, $CD8^+$ T proliferation flow chart

图2 21% O_2和5% O_2环境培养的hUCMSCs抑制PBMC增殖

Fig. 2 Ability to inhibit lymphocytes proliferation of hUCMSCs cultured in 21% O_2 and 5% O_2

表3 21%和5% O_2环境培养的hUCMSCs抑制PBMC、$CD8^+$ T细胞增殖的抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3 Inhibition rates of hUCMSCs cultured in 21% O_2 and 5% O_2 inhibited proliferation of lymphocytes and $CD8^+$T cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

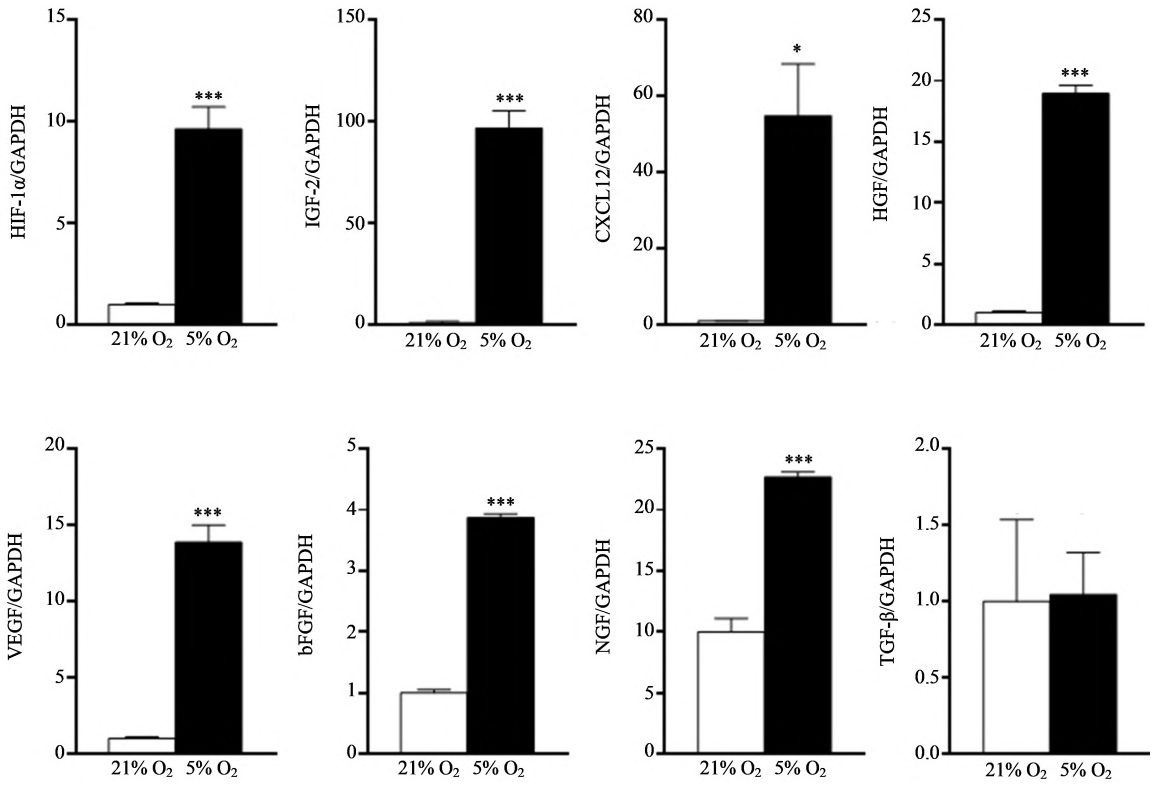
组别	子代细胞比例/%	总抑制率/%	$CD8^+$ T细胞子代细胞比例/%	$CD8^+$ T细胞抑制率/%
21% O_2	30.70±3.29	60.48±4.00	7.59±1.86	79.65±5.06
5% O_2	29.93±0.53	61.44±0.92	7.77±1.12	78.59±6.07

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.4 5% O_2培养环境对hUCMSCs相关生长因子表达的影响

如图3所示，在mRNA水平上，与21% O_2组比较，5% O_2组hUCMSCs HIF-1α、IGF-2、CXCL12、HGF、VEGF、bFGF、NGF mRNA表达水平显著升高（P＜0.05、0.001）；TGF-β无明显变化。

对在5% O_2培养环境下mRNA水平升高最明显的IGF-2进行了培养上清蛋白水平检测，5% O_2组hUCMSCs IGF-2的分泌能力显著高于21% O_2组（P＜0.001）（表4），与其在mRNA水平的表达相似。



与21% O_2组比较：$^{*}P$＜0.05 $^{***}P$＜0.001

$^{*}P$ < 0.05 $^{***}P$ < 0.001 *vs* 21% O_2 group

图3 21%和5% O_2环境培养的hUCMSCs相关生长因子mRNA表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 3 MRNA expression of related growth factors of hUCMSCs cultured in 21% and 5% O_2 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

表4 21%和5% O_2环境培养的hUCMSCs培养上清中IGF-2浓度（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4 Concentration of IGF-2 in supernatant of hUCMSCs cultured in 21% and 5% O_2 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	IGF-2/(pg·mL^{-1})
21% O_2	262.29±16.74
5% O_2	309.11±17.58***

与21% O_2组比较：$^{***}P$＜0.001

$^{***}P$ < 0.001 *vs* 21% O_2 group

4 讨论

MSCs具有再生潜能和免疫调节能力，在骨髓、脂肪组织、脐带、脐带血、羊水、胎盘、牙髓、肌腱、滑膜和骨骼肌等中均发现了MSCs[3-4]。曾作为废弃物的脐带由于其来源广泛、无伦理争议、易于分离、低免疫原性等优势被研究人员和应用者青睐，大量研究者正在评估将其应用于临床治疗的有效性和安全性。“国际细胞治疗协会”于2006年更新了MSCs的最低标准：（1）在标准培养环境中贴壁生长；（2）CD73、CD90、CD105阳性表达，表达率≥95%，CD34、CD45、CD14或CD11b、CD79α或CD19、HLA-DR阴性表达，表达率≤2%；（3）在体外能分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞[5]。尽管如此，不同实验室的研究者们制备出的MSCs在体外增殖能力、免疫调节能力、细胞因子及生长因子表达水平及分泌能力等方面仍存在较大差异，需要继续探索更合适的MSCs的体外培养方案[4]。

O_2浓度是影响MSCs体外培养的一个重要因素。大量的研究人员研究了O_2浓度对MSCs培养的影响，其中大多数研究发现低氧的培养环境似乎增加了MSCs的增殖、分化和免疫调节性能，而不影响其特性[3]。不同O_2水平对MSCs培养的影响在1958年首次被Cooper等[6]报道，目前已有文献报道

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

了使用不同的低氧环境培养MSCs，如1% O_2[7]、1.5% O_2[8]、2.5% O_2[9]、3% O_2[10]、5% O_2[11-12]等，不同的低氧环境对于MSCs的增殖能力和生物学特性的影响有相似之处，又不尽相同，甚至可能出现完全相反的结果[3,13]。导致不一致的原因可能包括MSCs的组织来源、异质性、低氧培养的时间长短、低氧培养环境的O_2浓度等。来源于不同组织的MSCs，如常见的骨髓源MSCs、脐带源MSCs、脂肪源MSCs等，其增殖能力本身就存在着较大差异，而即便是同一组织来源的MSCs，也因为个体差异、培养环境等的不同有着类似的问题。其次，低氧培养是长期进行还是短期刺激，这对MSCs的扩增影响都存在差异[13]。本研究中采用的是从P_0开始进行持续的5% O_2培养，在P_0培养过程中，低氧环境并未显示出其优势，但在分离后的培养过程中，低氧增强了hUCMSCs的增殖能力，这与文献报道的1%～5% O_2下长期培养的结果一致[13]。

MSCs具有免疫调节特性，研究表明，MSCs可影响体外免疫细胞的激活、增殖。在血管周围细胞龛中的O_2浓度平均约是5%，MSCs与T细胞在低氧微环境下发生相互作用时，低氧环境下对T细胞的活力无负面影响。低氧对MSCs和T细胞相互作用的影响研究较少，已报道的结果也存在矛盾：在1% O_2条件下，MSCs对$CD3^+/CD8^+$ T细胞（细胞毒性T细胞）和$CD3^+/CD4^+$ T细胞（辅助性T细胞）的增殖抑制能力增强，而在5% O_2条件下，MSCs的抑制能力与常氧条件下相同[14]。本研究将5% O_2环境培养的hUMSCs与PBMC分别在5% O_2和21% O_2条件下进行试验，发现其对PBMC的增殖抑制能力没有差别；在21% O_2环境下比较5% O_2组和21% O_2组hUCMSCs对$CD3^+/CD8^+$ T细胞及总淋巴细胞的增殖抑制能力没有差异。

通过自分泌和旁分泌作用分泌的可溶性因子是MSCs发挥治疗潜力的关键机制之一[15]。关于低氧对MSCs相关因子表达的影响，文献普遍认为低氧能促进其生长因子的表达和分泌。杨记农等[16]研究了不同O_2水平下脂肪MSCs和脐带MSCs的旁分泌能力，结果显示3% O_2和5% O_2的低氧环境均能够提高hUCMSCs VEGF、HGF、NGF和角质细胞生长因子（keratinocyte growth factor，KGF）的旁分泌效应。姚舜等[11]研究了5% O_2对hUCMSCs神经营养因子分泌功能的影响，低氧组脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）、VEGF、HGF、睫状节神经细胞营养因子（ciliary neurotrophic factor，CNTF）mRNA相对表达量均高于常氧组。张冲等[12]观察了5% O_2的低氧环境对hUCMSCs分泌VEGF、HGF、FGF-2、SDF-1、干细胞因子（stem cell factor，SCF）、IGF-1和粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor，G-CSF）表达的影响，结果显示低氧培养环境可促进VEGF、HGF、bFGF、SCF、SDF-1和G-CSF的表达，但对IGF-1表达无影响。本研究中检测了IGF-2、SDF-1α、HGF、VEGF、bFGF、NGF和TGF-β 7种MSCs相关生长因子在5% O_2和21% O_2环境培养后mRNA的表达情况。在mRNA水平上，除TGF-β外，5% O_2组hUCMSCs相关生长因子的表达明显高于21% O_2组。低氧对生长因子表达的调节和HIFs相关，而HIF-1α是细胞内对缺氧进行应答的关键调节转录因子[17]。本研究中5% O_2组HIF-1α表达水平高于21% O_2组，而生长因子的表达趋势与其一致，这可能是HIF-1α在低氧条件下调节的结果。

IGF是在胚胎着床前最早在胚胎中表达的生长因子之一，并作为自分泌/旁分泌因子作用于包括干细胞在内的许多发育细胞，是干细胞微环境的重要组成部分，可能在维持多能性和3个胚层的多谱系分化方面发挥重要作用[18]。据文献报道IGF-2通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K/AKT）增强人骨形成蛋白9（BMP-9）诱导的MSCs中早期成骨标志碱性磷酸酶和晚期标志物骨钙素、骨桥蛋白的表达[18]；Liu等[19]发现慢性肝损伤时，损伤部位周围的肝细胞分泌IGF-2，促进肝细胞增殖，修复损伤部位；Du等[20]发现对hUCMSCs进行低氧预处理后，通过产生IGF-2对实验性自身免疫性脑脊髓炎表现出很强的抗炎作用。本研究发现相比于常氧培养的hUMSCs，低氧培养的hUMSCs IGF-2 mRNA表达水平在检测的所有因子中最高，对IGF-2进行蛋白水平检测后发现其蛋白水平的表达与mRNA相似，与Youssef等[21]低氧培养胎盘MSCs后IGF-2的表达升高结果一致。低氧培养环境的hUCMSCs IGF-2升高，可能对将hUCMSCs应用于骨损伤、肝损伤、实验性自身免疫性脑脊髓炎等疾病的治疗是有利的。

与常氧培养相比，低氧培养增强了hUCMSCs的增殖能力，增强了相关生长因子的表达，特别是IGF-2的表达。但依然保持着与常氧环境培养的hUCMSCs相似的表型、三系分化能力以及淋巴细胞增殖抑制能力，这将更有利于hUCMSCs的应用。但值得关注的是，低氧培养MSCs受到很多因素的影响，如何根据应用需求探索制定出最合适的低氧

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

培养环境还存在很多挑战，这也是在MSCs治疗机制尚未明确的今天需要继续深入研究的方向之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, et al. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia [J]. Int J Biol Sci, 2010, 6(5): 499-512.

[2] Zhang H, Tao Y L, Liu H H, et al. Immunomodulatory function of whole human umbilical cord derived mesenchymal stem cells [J]. Mol Immunol, 2017, 87: 293-299.

[3] Widowati W, Rihibiha D D, Khiong K, et al. *Hypoxia in mesenchymal stem cell* [M/OL]. Licensee InTech, 2017. Doi:10.5772/62960.

[4] Yin J Q, Zhu J, Ankrum J A. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy [J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(2): 90-104.

[5] Dominici M, le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.

[6] Cooper P D, Burt A M, Wilson J N. Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture [J]. Nature, 1958, 182 (4648): 1508-1509.

[7] Zhao D W, Liu L J, Chen Q, et al. Hypoxia with Wharton's jelly mesenchymal stem cell coculture maintains stemness of umbilical cord blood-derived $CD34^+$ cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 158.

[8] Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, et al. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells [J]. Cell Commun Signal, 2010, 8: 18.

[9] Lönne M, Lavrentieva A, Walter J G, et al. Analysis of oxygen-dependent cytokine expression in human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord [J]. Cell Tissue Res, 2013, 353(1): 117-122.

[10] Obradovic H, Krstic J, Trivanovic D, et al. Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche [J]. Placenta, 2019, 82: 25-34.

[11] 姚 舜, 靳安民, 张 辉, 等. 低氧预处理对脐带间充质干细胞表型、增殖及神经营养因子分泌功能的影响 [J]. 山东医药, 2017, 57(32): 25-28.
Yao S, Jin A M, Zhang H, et al. Effects of hypoxic preconditioning on cell phenotype, proliferation, and secretion of neurotrophic factors of umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Shandong Med J, 2017, 57 (32): 25-28.

[12] 张 冲, 徐 敏, 毛成刚, 等. 低氧环境对脐带间充质干细胞相关细胞因子表达的影响 [J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(5): 437-440.
Zhang C, Xu M, Mao C G, et al. Effects of low oxygen on the expression of related cytokines in human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Chin Med Biotechnol, 2016, 11(5): 437-440.

[13] Samal J R K, Rangasami V K, Samanta S, et al. Discrepancies on the role of oxygen gradient and culture condition on mesenchymal stem cell fate [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10(6): e2002058.

[14] Gornostaeva A N, Bobyleva P I, Andreeva E R, et al. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia [J]. Tissue Cell, 2020, 63: 101320.

[15] Choi W, Kwon S J, Jin H J, et al. Optimization of culture conditions for rapid clinical-scale expansion of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. Clin Transl Med, 2017, 6(1): 38.

[16] 杨记农, 姜亦瑶, 袁 超, 等. 不同氧体积分数下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的旁分泌能力 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(21): 3322-3327.
Yang J N, Jiang Y Y, Yuan C, et al. Paracrine abilities of adipose-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells under different oxygen concentrations [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2018, 22(21): 3322-3327.

[17] Alijani N, Johari B, Moradi M, et al. A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells [J]. Cell Biol Int, 2019, 44(1): 14-26.

[18] Youssef A, Aboalola D, Han V K. The roles of insulin-like growth factors in mesenchymal stem cell niche [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 9453108.

[19] Liu J l, Hu X, Chen J, et al. Pericentral hepatocytes produce IGF-2 to promote liver regeneration during special injuries [J]. Hepatology, 2017,12(6): 66.

[20] Du L M, Lin L Y, Li Q, et al. IGF-2 preprograms maturing macrophages to acquire oxidative phosphorylation-dependent anti-inflammatory properties [J]. Cell Metab, 2019, 29(6): 1363-1375.

[21] Youssef A, Han V K. Low oxygen tension modulates the insulin-like growth factor-1 or -2 signaling via both insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor to maintain stem cell identity in placental mesenchymal stem cells [J]. Endocrinology, 2016, 157 (3): 1163-1174.

[责任编辑 兰新新]

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net