

冷藏保存时间对人少突胶质前体细胞的影响

汪兆艳, 王倩, 杨印祥, 屈素清, 杨辉, 叶豆, 门倩倩, 刘畅, 栾佐

[摘要] 目的 评价冷藏保存时间对人少突胶质前体细胞生物学特性的影响。方法 取生长状态良好的第3代人少突胶质前体细胞,按照 $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度重悬于含有10 g/L人血清白蛋白的50 g/L葡萄糖保存介质中,置于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 冷链运输箱中保存24 h、48 h、72 h,与新鲜制备的少突胶质前体细胞(即冷藏保存0 h细胞)比较,评价冷藏保存时间对细胞活率、增殖能力、迁移能力、免疫表型及分化能力的影响。将冷藏保存24 h的少突胶质前体细胞移植到脑白质损伤大鼠侧脑室内,观察移植细胞在体内成髓鞘情况。结果 与冷藏保存0 h细胞比较,冷藏保存24 h、48 h细胞活率没有显著差异,冷藏保存72 h细胞活率明显下降($P < 0.05$);通过CCK8法检测各组细胞增殖能力,结果显示冷藏保存24 h和48 h细胞增殖能力与冷藏保存0 h的细胞比较无显著差异,冷藏保存72 h细胞增殖能力显著下降($P < 0.05$);细胞体外迁移和分化结果显示,与冷藏保存0 h细胞比较,冷藏保存24 h的细胞迁移和分化能力无显著差异,冷藏保存48 h和72 h,细胞迁移和分化能力显著下降。体内实验证实,冷藏保存24 h的少突胶质前体细胞在体内可以分化为产髓鞘碱性蛋白的少突胶质细胞。结论 人少突胶质前体细胞在含有10 g/L人血清白蛋白的50 g/L葡萄糖保存介质中冷藏保存24 h,细胞活率、迁移和分化能力较好,因此,建议少突胶质前体细胞制剂冷藏保存24 h内移植,以确保最佳治疗效果。

[关键词] 少突胶质前体细胞;保存介质;细胞分化;细胞活率

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2022)05-0269-05

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2022.05.002

Impact of cryopreservation time on biological properties of human oligodendrocyte precursor cells

WANG Zhaoyan, WANG Qian, YANG Yinxiang, QU Suqing, YANG Hui, YE Dou, MEN Qianqian, LIU Chang, LUAN Zuo

(Department of Pediatrics, The Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the impact of cryopreservation time on biological properties of human oligodendrocyte precursor cells (OPCs). **Methods** Passage 3 human OPCs in normal growth were re-suspended in 50g/L glucose medium containing 10g/L human serum albumin (HSA) at a concentration of $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ and stored in the $2 \sim 8^\circ\text{C}$ cold-chain transport box for 24, 48 and 72 h, and were compared to freshly prepared oligodendrocyte precursor cells (OPCs stored for 0 h. Then, OPCs stored for 24 h were transplanted to the brain lateral ventricle of rats with white matter injury (WMI) to observe their myelination in vivo. **Results** Compared with the cells stored for 0 h, there was no significant difference in the viability of cells stored for 24 h and 48 h, but cell viability of OPCs stored for 72 h decreased significantly ($P < 0.05$). The result of CCK8 assay showed that there was no significant difference in cell proliferation between OPCs stored for 24 and 48 h and those stored for OPCs stored for 0 h, but cell proliferation of OPCs stored for 72 h was decreased significantly ($P < 0.05$). The results of cell migration and differentiation in vitro showed that compared with 0 h cells, there was no significant difference in cell migration and differentiation ability at 24 h, but significantly decreased at 48 h and 72 h. In vitro migration and differentiation experiments showed that the migration and differentiation abilities of OPCs decreased significantly with the increase of the length of cryopreservation time. The in vivo experiment demonstrated that OPCs stored for 24 h could differentiate to myelin basic protein (MBP)-positive oligodendrocytes. **Conclusion** Human oligodendrocyte precursor cells are refrigerated in 50g/L glucose storage medium containing 10g/L human albumin for 24 h, and the cell viability, migration and differentiation ability are the best. Therefore, it is recommended that oligodendrocyte precursor cells The preparation should be refrigerated and transplanted within 24 hours to ensure the best therapeutic effect.

[Keywords] Oligodendrocyte precursor cell; Storage medium; Differentiation; Proliferation; Viability

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFA0104200)

[作者单位] 100048 北京,解放军总医院第六医学中心儿科(汪兆艳,王倩,杨印祥,屈素清,杨辉,叶豆,门倩倩,刘畅,栾佐)

[通讯作者] 栾佐, E-mail: zuoluaneck@163.com

在中枢神经系统,少突胶质前体细胞(oligo-dendrocyte precursor cells, OPC)分化为少突胶质细胞(oligodendrocytes, OL),用于修复受损的髓鞘。目前 OPC 主要应用于脑白质损伤^[1]、脊髓损伤^[2]、神经退行性病变^[3]、缺血性脑卒中^[4]、脑出血^[5]、多发性硬化^[6]等疾病,临床应用前景值得期待^[7]。OPC 虽然已经应用于临床前研究与疾病治疗,但治疗效果却存在差异^[8],主要因为 OPC 制备过程存在一些影响细胞生物学特性的因素,进而影响临床治疗效果。有研究表明,细胞来源^[9-11]、不同的处理方式^[11]、移植细胞数量^[12-13]、移植时间窗^[14]、移植路径^[15]及受试者个体差异^[16]都会对治疗效果产生影响。在以上因素中,移植前细胞质量对临床治疗效果影响最为直接,而细胞保存介质、保存时间、保存温度等因素直接影响移植前细胞质量。然而,关于 OPC 在冷藏保存介质中保存不同时间是否会影 响细胞生物学特性及冷藏保存后的 OPC 移植到体内是否会分化为产髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的 OL 却鲜有报道。本研究以人神经干细胞来源的 OPC 为研究对象,评价不同冷藏保存时间对 OPC 生物学特性的影响,为 OPC 的进一步临床转化提供可能的参数指导。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 二氧化碳培养箱购自日本 SANYO 公司;生物安全柜购自新加坡 ESCO 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;低温低速离心机购自美国贝克曼库尔特公司;冷藏运输箱购自上海元廷生物公司;人血白蛋白购自安徽大安生物公司;PDGFR- α -BV421 及同型对照 IgG 均购自美国 BD 公司;A2B5-PE 及同型对照 IgM 流式抗体均购自德国 Miltenyi Biotec 公司;Olig2、Galc 免疫荧光染色抗体购自德国 Miltenyi Biotec 公司;山羊抗兔荧光二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司;迁移小室 Transwell 购自美国康宁公司;CCK8(Cell Counting Kit-8)检测试剂盒购自日本同仁化学公司;OPC 完全培养基由本实验室自配。

1.2 实验方法

1.2.1 OPC 培养与传代 NSC-9 神经干细胞系从 12 周人胎脑皮质分离获得,在含有表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的 DMEM/F12 培养基中扩增为神经球,每 10 天用 Accutase 消化传代一次。取 P10 代神经球消化成单细胞并重悬于 OPC 完全培养基,按照 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 层粘连蛋白(laminin, LN)处理的六孔板中,间隔 3~4 d 半量换液,每 5 天 Accutase 消化传代一次,第三代细胞用于冷藏实验研究。

1.2.2 OPC 冷藏保存 第三代 OPC, Accutase 消化,台盼兰染色计数后重悬于含有 10 g/L HSA 的 50 g/L 葡萄糖保存介质中,然后将细胞悬液转移至 0.5 mL eppendorf 管,细胞终浓度为 $4 \times 10^6/100 \text{ mL}$ 。根据冷藏保存时间的不同,实验分为 4 组,每组三支细胞悬液。1 组:冷藏保存 0 h;2 组:冷藏保存 24 h;3 组:冷藏保存 48 h;4 组:冷藏保存 72 h。将准备好的细胞置于 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏运输箱内保存。为了确保冷藏运输箱内温度稳定,在细胞冷藏保存前对冷藏箱内温度进行校验。

1.2.3 细胞活率检测 冷藏保存不同时间的 OPC,重悬于适量体积冷藏保存介质中,充分混匀后吸取细胞悬液 10 mL 与台盼兰 10 mL 混合,取 10 mL 细胞悬液充入计数池计数,每组细胞取样 3 次计数并取平均值。活细胞不着色并保持正常形态,死亡细胞蓝染,细胞活率计算公式为:细胞活率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞表型检测 冷藏保存不同时间的 OPC,计数后均分至流式管中,每管 5×10^5 个细胞。流式标记方法为:PBS 洗涤细胞, $400 \times g$ 离心 5 min,弃上清并混匀细胞,每管加 Fc 阻断剂 5 mL,室温放置 10 min,根据说明书每管分别加荧光标记的鼠抗人 PDGFR- α 、A2B5 抗体及对应的及同型抗体, 4°C 孵育 30 min, PBS 洗涤后重悬细胞; Olig2 为兔抗人抗体,一抗室温孵育 2 h,二抗室温孵育 1 h, PBS 洗涤并重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞增殖能力检测 冷藏保存不同时间的 OPC,重悬于 OPC 完全培养基中,按照每孔 6.0×10^3 密度接种于 LN 包被的 96 孔板中,每组 5 孔。根据 CCK-8 试剂使用说明书,每天同一时间每孔加 10 mL CCK8 溶液于培养箱内孵育 4 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度(optical density, OD)。连续检测 7 d,以时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.6 细胞迁移能力检测 冷藏保存不同时间的 OPC,通过 Transwell 小室检测细胞迁移能力,具体操作方法为:8 mm 孔径的 Transwell 小室,小室上室和下室分别加 0.1 mL 和 0.5 mL 包被液置于培养箱中孵育 45 min。吸弃包被液,下室内加入 OPC 完全培养基 0.5 mL,上室内接种重悬于 OPC 完全培养基的细胞 2×10^4 个, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 18 h,取出小室,彻底吸弃上室内的液体,用润湿的无菌棉签轻柔擦拭上室底面,擦去未迁移的细胞,将小室浸入 4% 多聚甲醛,室温固定 10 min, PBS 洗 3 次, DAPI 复染 5 min。荧光显微镜拍照整个视野,用 Image J 软件计算 DAPI 阳性细胞数量。

1.2.7 细胞体外分化能力检测 冷藏保存不同时间的 OPC,重悬于自配 OPC 分化培养基中,按照 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于多聚 L-鸟氨酸氢溴酸盐(poly-L-ornithine hydrobromide, PLO)和 LN 包被的 24 孔板,每隔 3 天半量换液,分化 3 周, 4% 多聚甲醛固定细胞,室

温固定 10 min, PBS 清洗细胞, 0.3% Triton X-100 室温破膜 10 min, PBS 清洗细胞, 3% BSA 室温封闭 1 h, 吸弃封闭液加 Galc 抗体 (1:100) 4 °C 冰箱过夜, 彻底吸弃一抗, PBS 清洗细胞后加荧光标记的驴抗兔 IgG (1:250), 室温孵育 2 h, PBS 清洗细胞, DAPI 复染 5 min, 荧光显微镜下拍照, 计算阳性细胞比例。

1.2.8 细胞体内成髓鞘检测 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 孕鼠购自北京维通利华实验动物有限公司, 动物实验伦理号为: SCXK-2012-0001。出生后第 3 天的 SD 大鼠, 结扎右侧颈总动脉, 6% 氧气缺氧 90 min, 建立早产儿脑白质损伤 (white matter injury, WMI) 模型。造模后第 7 天, 每只鼠通过立体定位仪经侧脑室移植冷藏 24 h 的 OPCs 3×10^5 个 ($n=10$), 移植后 12 周通过 MBP 和 Stem121 免疫荧光双染色法观察移植细胞体内成髓鞘能力。

1.2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验数据符合方差齐性检验时, 多组之间进行比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活率比较 冷藏保存不同时间 OPC, 台盼蓝染色计数结果显示, 与冷藏保存 0 h 比较, 冷藏保存 24 h、48 h 细胞活率没有显著性差异, 冷藏保存 72 h 的 OPC 虽然细胞活率超过 85%, 但与冷藏保存

0h 组比较, 细胞活率显著下降 (图 1, $P < 0.01$)。

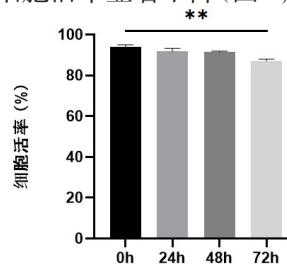


图 1 冷藏保存不同时间 OPC 活率比较

** $P < 0.01$.

2.2 冷藏保存不同时间细胞增殖能力比较 CCK8 法检测各组细胞增殖能力, 结果显示, 与冷藏保存 0h 比较, 冷藏保存 24h、48h, 细胞增殖能力没有明显变化, 冷藏保存 72h, OPC 增殖能力呈明显下降趋势 (图 2)。

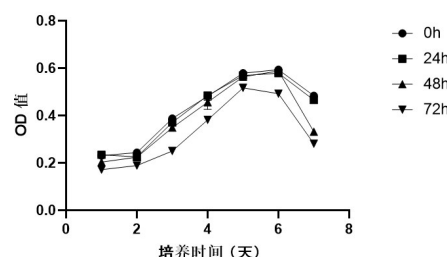


图 2 冷藏保存不同时间 OPC 增殖能力比较

2.3 冷藏保存不同时间 OPC 表型比较 流式检测结果显示, 冷藏保存不同时间 OPC 特异性标志物 PDGFR、Olig2、A2B5 无明显变化, 各组之间进行比较差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

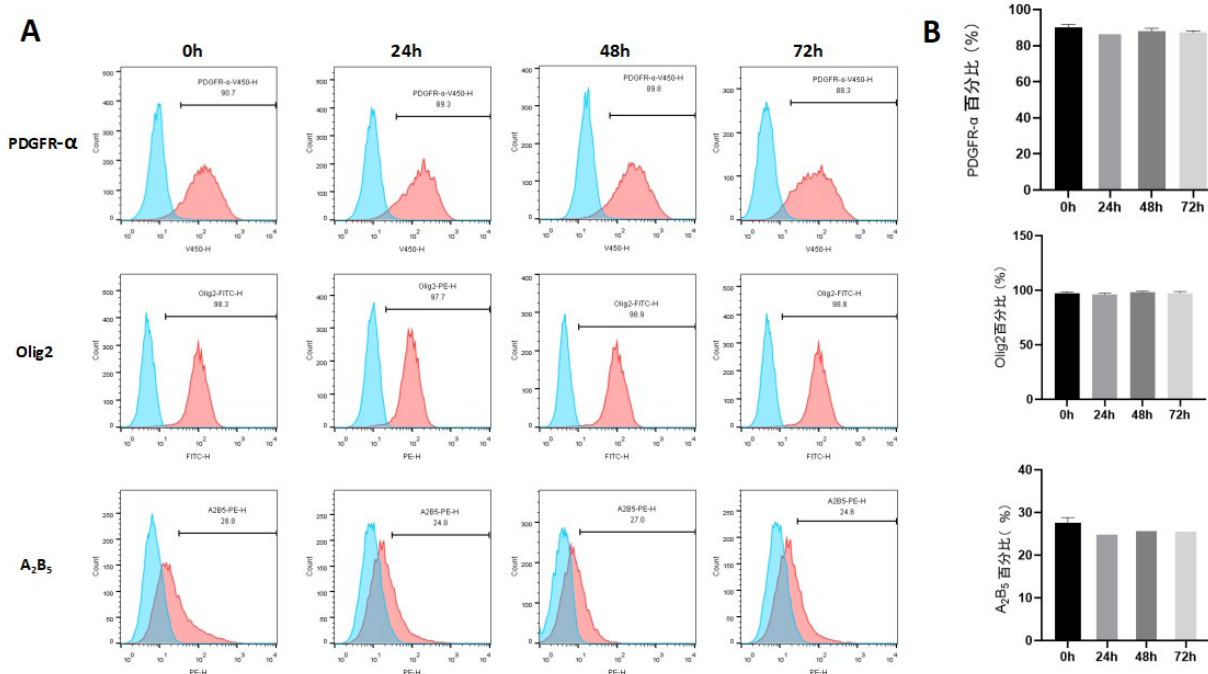


图 3 冷藏保存不同时间 OPC 表型的鉴定

A: 冷藏保存不同时间 OPC 表型流式检测结果; B: 冷藏保存不同时间 OPC 表型统计分析结果

2.4 冷藏保存不同时间 OPC 迁移能力比较 Transwell 法检测细胞迁移能力, 结果显示, 与冷藏保存 0 h 比较, 冷藏保存 24 h OPC 迁移能

力没有显著变化, 冷藏保存 48 h 和冷藏保存 72 h, 细胞迁移率下降, 差异具有统计学意义 (图 4, $P < 0.05$)。

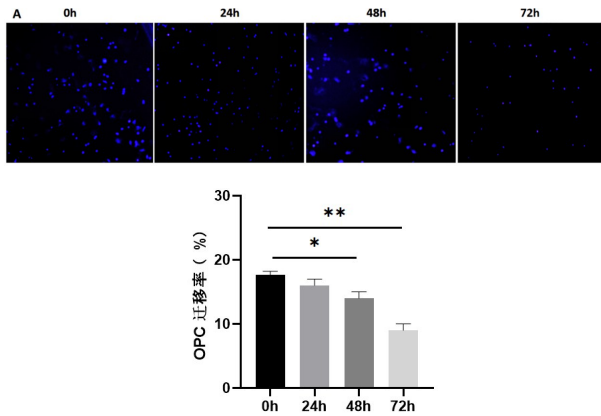


图4 冷藏保存不同时间OPC迁移能力比较

A:冷藏保存不同时间OPC迁移结果(DAPI染色, $\times 100$);

B:OPC迁移率定量分析(* $P<0.05$ ** $P<0.01$)

2.5 冷藏保存不同时间OPC分化能力 冷藏保存不同时间的OPC均可分化为少突胶质细胞,少突胶质细胞特异性标志物Galc免疫荧光染色结果显示,与冷藏保存0h比较,冷藏保存24hGalc阳性率没有显著差异($P>0.05$),随着冷藏保存时间的延长,冷藏保存48h和冷藏保存72hOPC分化为少突胶质细胞比例下降,而冷藏保存72hOPC分化为Galc阳性少突胶质细胞的比例下降更为明显(图5, $P<0.05$)。

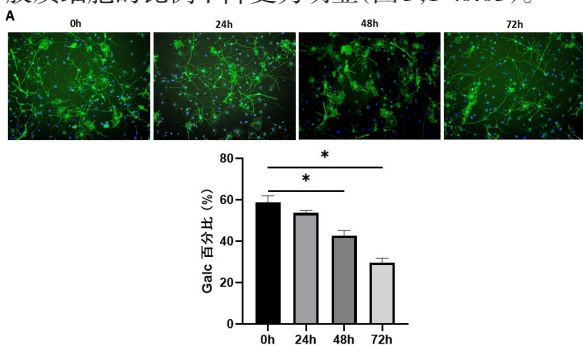


图5 冷藏保存不同时间OPC分化能力的比较

A:冷藏保存不同时间OPC Galc免疫荧光染色结果(免疫荧光细胞化学染色, $\times 200$); B:冷藏保存不同时间OPC Galc免疫荧光染色百分比, * $P<0.05$.

2.6 冷藏保存24h OPC体内成髓鞘能力 将冷藏保存24h的OPC移植到WMI大鼠侧脑室,细胞移植后3个月,MBP和Stem121免疫荧光染色结果显示,移植细胞在损伤的白质中能够分化为MBP阳性的少突胶质细胞,证明冷藏保存24h的OPC在体内具有良好的活性和迁移能力并且分化为产MBP的少突胶质细胞。

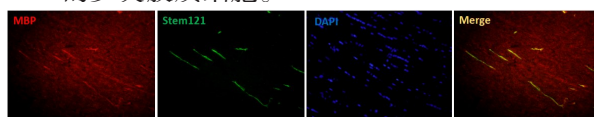


图6 冷藏保存24h OPC MBP和Stem121染色(免疫荧光染色, $\times 200$)

3 讨论

干细胞制剂进行临床移植前,必须保存于经美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准可直接输注于人体的保存介质中进行移

植。在实验研究过程中,干细胞制剂制备后很快移植到动物体内,但在临床转化过程中很难实现即刻移植,这是因为细胞制备需要在GMP(Good Manufacturing Practice, GMP)实验室完成,而细胞移植需要在经国家批准的医院内进行,因此,干细胞制剂需要在冷藏介质中保存一定时间才能输注给患者。虽然目前干细胞冻存技术较为成熟^[17-18],但由于细胞复苏活率低、细胞复苏后需要恢复一定时间才能发挥免疫调节作用^[19-20]、冷冻保护剂对人体有害^[21]、复苏细胞对实验室环境要求高,因此并不适用于干细胞短期保存。

目前尚无关于OPCs保存条件的相关研究或指南,不同研究采用的冷藏保存介质不尽相同^[22], Wang等^[23]采用PBS, Zhang等^[24]采用培养基作为细胞制剂冷藏保存介质,但这些保存介质只适用于实验研究,不适合临床转化。5%葡萄糖注射液是经典的药物溶剂。有研究指出,高糖环境会影响干细胞的活性和增殖能力^[25],但也有研究^[26]认为,5%葡萄糖注射液在短期内可维持干细胞的活性。在冷藏保存液中加入一定浓度的人血白蛋白对细胞存活具有保护作用,然而,保存液中人血白蛋白浓度并不是越高越好,chen等^[27]在间充质干细胞冷藏保存实验研究中发现,高浓度的人白蛋白并不利于提高细胞存活。因此我们在临床常用的药物溶媒5%葡萄糖注射液中加入1%人血白蛋白,评价OPC在此种冷藏保存介质中保存不同时间对细胞生物学特性的影响。

我们在研究过程中发现,冷藏保存24h和冷藏保存0h的OPC比较,细胞活率和增殖能力虽然没有显著差异,但随着保存时间的增加,细胞活率和增殖能力整体呈下降趋势。除了细胞活率和增殖能力,细胞迁移能力是实现临床有效治疗非常重要的指标^[28]。有研究发现,人神经干细胞移植治疗脱髓鞘小鼠,仅在注射部位形成髓鞘,髓鞘形成不良的原因主要是移植细胞迁移能力不足^[29]。有文献报道,OPCs的迁移和趋化因子受体表达有关。中枢神经系统正常发育的OPCs依赖于CXCR4信号迁移到白质中形成髓鞘^[30],然而目前尚无关于冷藏保存对OPC迁移能力影响的文献报道。本研究通过Transwell迁移实验发现,与冷藏保存0h OPC比较,冷藏保存48h的OPC迁移能力降低,而保存72h的OPC迁移能力降低更为显著。有研究表明细胞迁移能力随着保存时间的延长而下降的原因可能与冷藏过程中细胞氧化应激水平升高引起的细胞损伤有关^[31]。

细胞分化能力是反映OPCs冷藏保存效果较为客观的指标。我们在研究中发现,冷藏保存48h和72h的OPC分化为少突胶质细胞的比例较冷藏保存0h有显著差异。然而,移植到体内的OPC只有分化为少突胶质细胞包绕神经元轴突才能修复受损的髓鞘^[32, 33],发挥其生物学功能。为了验证冷藏保存后的OPCs在体内是否能够形成髓鞘,我们择

优选冷藏保存24h的OPCs移植到脑白质损伤大鼠脑内,免疫荧光染色结果显示冷藏保存24h的OPCs具有良好的迁移能力并分化为产MBP的少突胶质细胞。

尽管OPC冷藏保存不同时间细胞特异性标记没有发生变化,并且冷藏保存48h和72h仍能达到FDA对细胞移植活率不低于70%的要求,但随着保存时间的增加,细胞体外迁移和分化能力呈下降趋势。因此,建议OPC制剂在含1%人血白蛋白的5%葡糖糖注射液中冷藏保存24h内使用。

总之,我们在体外实验初步探索了人少突胶质前体细胞冷藏保存不同时间对细胞生物学特性的影响,体内进一步证实冷藏保存24h的OPCs移植到体内能够形成髓鞘,发挥生物学功能。但在实际临床转化过程中,干细胞产品不可避免需要更长距离的运输,因此冷藏保存48h和72h的OPCs在体内是否具有成髓鞘能力还有待验证。在未来研究中,我们将继续探索在保存介质中添加具有细胞保护作用或能为细胞提供营养的成分,如复合氨基酸、维生素等,以此提高细胞活性,延长保存时间,为临床转化提供质量合格、安全有效的干细胞产品。

【参考文献】

- [1] Xu L, Ryu J, Hiel H, et al. Transplantation of human oligodendrocyte progenitor cells in an animal model of diffuse traumatic axonal injury: survival and differentiation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015;6(1):93.
- [2] Piao J, Major T, Auyeung G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2015,16(2):198-210.
- [3] Micu I, Plemel JR, Caprariello AV, et al. Axo-myelinic neurotransmission: a novel mode of cell signalling in the central nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018,19(1):49-58.
- [4] Li W, He T, Shi R, et al. Oligodendrocyte precursor cells transplantation improves stroke recovery via oligodendrogenesis, neurite growth and synaptogenesis[J]. *Aging Dis*, 2021,12(8):2096-2112.
- [5] Kang M, Yao Y. Oligodendrocytes in intracerebral hemorrhage[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019,25(10):1075-1084.
- [6] Buzzard K, Chan WH, Kilpatrick T, et al. Multiple sclerosis: basic and clinical[J]. *Adv Neurobiol*, 2017,15:211-252.
- [7] Chanoumidou K, Mozafari S, Baron-Van EA, et al. Stem cell derived oligodendrocytes to study myelin diseases[J]. *Glia*, 2020,68(4):705-720.
- [8] Hu XC, Lu YB, Yang YN, et al. Progress in clinical trials of cell transplantation for the treatment of spinal cord injury: how many questions remain unanswered? [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(3):405-413.
- [9] Buchet D, Garcia C, Deboux C, et al. Human neural progenitors from different foetal forebrain regions remyelinate the adult mouse spinal cord[J]. *Brain*, 2011,134(Pt 4):1168-1183.
- [10] Mozafari S, Laterza C, Roussel D, et al. Skin-derived neural precursors competitively generate functional myelin in adult demyelinated mice[J]. *J Clin Invest*, 2015,125(9):3642-3656.
- [11] Genc B, Bozan HR, Genc S, et al. Stem cell therapy for multiple sclerosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019,1084:145-174.
- [12] Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, et al. Concise review: review and perspective of cell dosage and routes of administration from preclinical and clinical studies of stem cell therapy for hard disease[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016,5(2):186-191.
- [13] Piltti KM, Funes GM, Avakian SN, et al. Increasing human neural stem cell transplantation dose alters oligodendroglial and neuronal differentiation after spinal cord injury[J]. *Stem Cell Reports*, 2017,8(6):1534-1548.
- [14] Izrael M, Zhang P, Kaufman R, et al. Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007,34(3):310-323.
- [15] Ikehara S. A new bone marrow transplantation method for stem cell disorders[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009,1173:774-780.
- [16] Hermann A, List C, Habisch HJ, et al. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies[J]. *Cytotherapy*, 2010,12(1):17-30.
- [17] Gao S, Ogawa M, Takami A, et al. Practical and safe method of long-term cryopreservation for clinical application of human adipose-derived mesenchymal stem cells without a programmable freezer or serum[J]. *Cryo Letters*, 2020,41(6):337-343.
- [18] Haack-Sorensen M, Ekblond A, Kastrup J. Cryopreservation and revival of human mesenchymal stromal cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2016,1416:357-374.
- [19] Francois M, Copland IB, Yuan S, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-gamma licensing[J]. *Cytotherapy*, 2012,14(2):147-152.
- [20] Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties?[J]. *Stem Cells*, 2014,32(9):2430-2442.
- [21] Moll G, Geissler S, Catar R, et al. Cryopreserved or Fresh Mesenchymal Stromal Cells: Only A Matter Of Taste Or Key To Unleash The Full Clinical Potential Of Msc Therapy?[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016,951:77-98.
- [22] Suzuki T, Ota C, Fujino N, et al. Improving the viability of tissue-resident stem cells using an organ-preservation solution[J]. *FEBS Open Bio*, 2019,9(12):2093-2104.
- [23] Wang L, Geng J, Qu M, et al. Oligodendrocyte precursor cells transplantation protects blood-brain barrier in a mouse model of brain ischemia via Wnt / beta-catenin signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(1):9.
- [24] Zhang JM, Wang H, Fan YY, et al. Effect of mesenchymal stem cells transplantation on the changes of oligodendrocyte lineage in rat brain with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Brain Behav*, 2021,11(2):e1999.
- [25] 郑咏舰,张凤玲,邓呈亮,等. 高糖微环境对脂肪来源干细胞生物学活性影响的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020,34(12):1602-1606.
- [26] Pal R, Hanwate M, Totey SM. Effect of holding time, temperature and different parenteral solutions on viability and functionality of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells before transplantation[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008,2(7):436-444.
- [27] Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation[J]. *Cell Transplant*, 2013,22(6):1075-1086.
- [28] Srivastava RK, Bulte J, Walczak P, et al. Migratory potential of transplanted glial progenitors as critical factor for successful translation of glia replacement therapy: The gap between mice and men[J]. *Glia*, 2018,66(5):907-919.
- [29] Gupta N, Henry RG, Strober J, et al. Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain[J]. *Sci Transl Med*, 2012,4(155):137r-155r.
- [30] Banisadr G, Frederick TJ, Freitag C, et al. The role of CXCR4 signaling in the migration of transplanted oligodendrocyte progenitors into the cerebral white matter[J]. *Neurobiol Dis*, 2011,44(1):19-27.
- [31] Al-Oqail M M, Farshori N N, Al-Sheddi E S, et al. Petroselinum sativum protects HepG2 cells from cytotoxicity and oxidative stress induced by hydrogen peroxide[J]. *Mol Biol Rep*, 2020,47(4):2771-2780.
- [32] Kuhn S, Gritti L, Crooks D, et al. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond[J]. *Cells*, 2019,8(11):424
- [33] Wang F, Yang YJ, Yang N, et al. Enhancing oligodendrocyte myelination rescues synaptic loss and improves functional recovery after chronic hypoxia[J]. *Neuron*, 2018,99(4):689-701.