## 含血清及无血清培养对间充质干细胞生物特征的影响

娄云云1,2,丁 凯1,2,慈小燕1,2\*,李 虹3\*,闫凤英1,2

- 1. 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301
- 2. 天津市细胞技术创新中心,天津和创生物技术有限公司,天津 300301
- 3. 天津市第一中心医院 产科, 天津 300192

摘 要:目的 研究含胎牛血清 (FBS) 培养基、无血清培养基 (SFM) 对不同扩增代次间充质干细胞 (MSCs) 生物特征的 影响。方法 制备人脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 并进行表面标志物及三系分化鉴定;用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完 全培养基及 SFM (1~4) 连续培养制备的 MSCs,取 P3/P5/P10/P15 代次,显微镜下观察形态,用细胞计数仪进行细胞直径 分析;计数并绘制生长曲线;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测端粒酶逆转录酶 (*TERT*)、*p53、p21、p16、*p53 上调调亡 调控因子 (*PUMA*) mRNA 表达;进行软琼脂成克隆能力分析、核型分析。结果 制备的 MSCs 经鉴定均符合要求;在含血 清培养条件下,MSCs 生长状态、大小和增殖能力相对稳定;SFM 培养下,MSCs 生长状态、大小和增殖能力差别较大,前 期增殖速度快,细胞形态更小更细长,后期增殖速度明显降低;端粒酶检测结果显示,在含血清培养下 MSCs 中 *TERT* 的 mRNA 表达相对稳定,与同代次 FBS 培养条件比较,P3、P5 代中各 SFM 培养条件下 *TERT* 的表达量均显著升高 (*P*<0.01、 0.001);P10 代中 SFM-3、SFM-4,P15 代中 SFM-4 培养条件下 *TERT* 的表达量均显著升高 (*P*<0.01、 0.001);P10 代中 SFM-3、SFM-4,P15 代中 SFM-4 培养条件下 *TERT* 的表达量均显著升高 (*P*<0.05、0.01);软琼脂克隆检 测结果显示,血清/SFM-2/3/4 培养的不同代次 MSCs 均无阳性克隆形成,SFM-1 培养的 P5 代 MSCs 在每孔 300、600 个铺 板条件下,有阳性克隆形成;与含血清培养条件相比,无血清培养下,*p53、p21、p16、PUMA* 在 P10 代均发生显著性增高 (*P*<0.001);但各条件 MSCs 的核型中均未发现染色体异常或畸变,表明核型均是稳定的。结论 传统含血清培养的 MSCs 生长更稳定,安全性高,提示细胞研发机构的 MSCs 如果涉及无血清培养,要做好工艺稳定性、安全性及有效性验证,以保 证细胞质量。

关键词:间充质干细胞;血清培养;无血清培养;生物特征;安全性
中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 6376(2025)06 - 1507 - 10
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.012

# Influence of serum and serum-free medium conditions on biological characteristics of mesenchymal stem cells

LOU Yunyun<sup>1, 2</sup>, DING Kai<sup>1, 2</sup>, CI Xiaoyan<sup>1, 2</sup>, LI Hong<sup>3</sup>, YAN Fengying<sup>1, 2</sup>

1. State Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin 300301, China

- 2. Center of Tianjin Cell Technology Innovation, Tianjin He Chuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China
- 3. Tianjin First Central Hospital, obstetrics department, Tianjin 300192, China

**Abstract: Objective** The effects of fetal bovine serum (FBS)-containing medium and serum-free medium (SFM) on the biological characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs) at different passages were investigated. **Methods** Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) were prepared and identified for surface markers and tri-lineage differentiation. MSCs were continuously cultured in DMEM/F-12 complete medium containing 10% FBS and SFM (1-4). Cells at passages P3/P5/P10/P15 were taken for microscopic observation of morphology, cell diameter analysis with a cell counter, cell counting and growth curve drawing. The mRNA expression of telomerase reverse transcriptase (*TERT*), *p53*, *p21*, *p16*, and p53 upregulated modulator of apoptosis (*PUMA*)

收稿日期: 2024-11-01

基金项目: 天津市科技计划项目细胞制品的成药性及转化研究资助项目(23ZGCXQY00050); 天津市科技计划项目细胞和基因治疗产品概念 验证平台建设资助项目(24ZYCGCG00600)

作者简介: 娄云云,助理研究员,主要从事细胞研发。E-mail: louyunyun@tipr.com.cn

<sup>\*</sup>通信作者: 慈小燕(1987—),副研究员,主要从事细胞研发。E-mail: cixy@tjipr.com.cn

李 虹 (1963一), 主任医师, 主要从事妇科常见病诊治。E-mail: lihong0214@126.com

was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Soft agar colony formation ability and karyotype analysis were performed. Results The prepared MSCs met the requirements after identification. Under serum-containing culture conditions, the growth state, size and proliferation ability of MSCs were relatively stable. Under SFM culture conditions, the growth state, size and proliferation ability of MSCs varied greatly. The proliferation rate was faster in the early stage, and the cell morphology was smaller and more slender. The proliferation rate decreased significantly in the later stage. Telomerase detection results showed that the mRNA expression of TERT in MSCs under serum-containing culture conditions was relatively stable. Compared with the FBS culture conditions of the same passage, the expression of TERT in SFM-1, SFM-2, SFM-3, and SFM-4 culture conditions at P3 and P5 passages was significantly increased (P < 0.01, 0.001). At P10 passage, the expression of TERT in SFM-3 and SFM-4 culture conditions was significantly increased (P < 0.05, 0.01). At P15 passage, the expression of TERT in SFM-4 culture conditions was significantly increased (P < 0.01). Soft agar colony formation detection results showed that no positive colonies were formed in different passages of MSCs cultured in serum/SFM-2/3/4. In P5 passage MSCs cultured in SFM-1, positive colonies were formed when 300 and 600 cells were seeded per well. Compared with serum-containing culture conditions, the expression of p53, p21, p16, and PUMA in P10 passage MSCs under serum-free culture conditions was significantly increased (P < 0.001). However, no chromosomal abnormalities or aberrations were found in the karyotypes of MSCs under all conditions, indicating that the karyotypes were stable. Conclusions Traditional serum-containing culture of MSCs has more stable growth and higher safety. It is suggested that if MSCs from cell research institutions involve serum-free culture, the stability, safety and effectiveness of the process should be verified to ensure cell quality. Key words: mesenchymal stem cells; serum culture-medium; serum-free medium; biological characteristics; safety

人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)是从新生 儿脐带华通氏胶分离提取的一种间充质干细胞 (MSCs)<sup>[1-2]</sup>,除了具有分化为不同细胞类型的多 系潜能外,还可以发挥免疫调节和组织再生作用。 MSCs 移植已被广泛应用于各种疾病的治疗,如膝 骨关节炎、心血管疾病、神经退行性疾病、肝脏功 能异常和免疫相关疾病。

大量的临床研究证明,若细胞制造过程得到充 分控制,MSCs 具有良好的安全性和有效性;而培 养工艺是细胞制造过程的关键因素,可引起细胞生 物学特性改变<sup>[3]</sup>。MSCs 在多个层面具有异质性,涉 及培养工艺的主要为培养条件和扩增代次。为了进 一步明确培养工艺对 MSCs 生物特性的影响,本课 题组通过体外手段,研究了不同培养基[含胎牛血清 (FBS)、无血清培养基(SFM)]、不同扩增代次 (P3/P5/P10/P15)对细胞生物特性的影响。

#### 1 材料

#### 1.1 主要试剂

脐带均由天津第一中心医院提供,产妇对脐带 处理均签订知情同意书,获得天津第一中心医院医 学伦理委员会批准,伦理会批件编号 2020N222KY。

HeLa 细胞,采购自中国科学院典型培养物保 藏委员会细胞库。

DMEM/F12 Basic 培 养 基 ( 货 号 C11330500BT)、D-MEM/F-12Basic 培养基粉末(货 号 12500-062)、TrypLE<sup>TM</sup>酶、FBS、磷酸盐缓冲液 (PBS)、双抗、DEPC 水、RNA 提取试剂盒(Gibco 公司);4种不同的 SFM-1~4为 MSCs 产品研发机 构常用的商品化 SFM,品牌涉及友康生物科技(北 京)股份有限公司、STEMCELL 公司和 Thermo 公 司。培养瓶、离心管、冻存管、移液管、细胞培养 板(Corning 公司);人 MSCs 表面标记检测试剂盒 (义翘神州公司);Agar (Diamond 公司);氯化硝 基四氮唑蓝(NBT)(Aladdin 公司);MSCs 诱导成 脂、成骨、成软骨试剂盒(BI 公司);Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)、逆转录试剂 盒(Roche 公司)。

#### 1.2 主要仪器

AC2-4S8-CN 生物安全柜、CCL-170B-8 二氧化 碳培养箱 (ESCO 公司); CKX41 倒置相差显微镜、 IX73 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 公司); IC1000 全自动细胞计数仪 (Countstar 公司); FACSCelesta 流式细胞仪 (BD 公司); Sorvall ST4R Plus 台式低 速冷冻离心机、Sorvall Legend Micro 17R 台式高速 离心机、905GP 超低温冰箱 (Thermo 公司); LightCycler 480 II荧光定量 PCR 仪 (罗氏公司)。

## 2 方法

#### 2.1 MSCs 的分离培养及鉴定

2.1.1 hUC-MSCs 的分离培养 将脐带组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块,贴于 T75 培养 瓶,用 DMEM/F-12 培养液培养,倒置显微镜下观 察并拍照,当细胞达 50%融合率时,进行传代培养,

#### 计为第1代细胞。

2.1.2 细胞鉴定 按照检测试剂盒说明书操作,以 TrypLE<sup>TM</sup>酶消化收集 P2 代 MSCs, PBS 洗涤 3 次, 分装成每管 5×10<sup>5</sup> 个细胞,每种抗体加入 20 μL,轻 轻混匀细胞,4 ℃避光孵育 20 min,用染色缓冲液 洗涤细胞 2 次,用 500 μL 染色液重悬细胞,流式细 胞仪检测分析 CD73、CD90、CD105、CD14、CD34、 CD45、CD79α、HLA-DR 水平。

2.1.3 三系分化鉴定 以 TrypLE™酶消化收集 P2 代 MSCs,用培养基调整细胞至 5×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>,铺 至培养板,隔天更换成骨、成脂、成软骨细胞诱导 培养基,以后隔天换液,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培 养箱中连续培养,21d 后分别进行茜素红、油红 O、 阿利辛蓝染色后拍照。

## 2.2 MSCs 的生长状态及大小观察

取分离到的 P2 代 MSCs,分别用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基及 SFM-1~4 连续培养。 取 P3/P5/P10/P15 代次的 MSCs 细胞,用显微镜拍 摄生长状态,当培养瓶内细胞融合率达到 85%~

90%,用 TrypLE<sup>™</sup> 酶消化,获得细胞悬液,用细胞 计数仪进行细胞直径分析。

#### 2.3 MSCs 的增殖能力分析

取 P3/P5/P10/P15 代次的 MSCs 细胞,铺板于 12 孔板内,每孔 4×10<sup>4</sup> 个,分别在培养 1、2、3、 4、8 d 用 TrypLE<sup>™</sup> 酶消化细胞并计数,根据计数 结果绘制增殖曲线,进行增殖能力分析。

#### 2.4 MSCs 的端粒酶活性检测

取 HeLa 细胞及用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基及 SFM-1~4 培养的、P3/P5/P10/P15 代 次的 MSCs 细胞,用 TRIzol 溶液提取对数生长期细 胞的 mRNA,实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 端粒酶逆转录酶 (*TERT*)及内参基因 (*GAPDH*) 的 mRNA 表达;反应条件为 95 ℃预变性 10 min, 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火 1 min, 40 个循环, 60~95 ℃熔解曲线分析。引物信息见表 1。将 HeLa 细胞的 *TERT/GAPDH* 的相对表达量归一化 为 1.0,比较不同条件下培养的 MSCs 的 *TERT* 的 相对表达水平。

表 1 引物序列 Table 1 Primers sequence

引物名称	正向引物 (5'→3')	反向引物(5'→3')	
TERT	GCCGATTGTGAACATGGACTACG	GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAA	
P21	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG	
P53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	
p16	CTCGTGCTGATGCTACTGAGGA	GGTCGGCGCAGTTGGGCTCC	
PUMA	ACGACCTCAACGCACAGTACGA	CCTAATTGGGCTCCATCTCGGG	
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	

#### 2.5 MSCs 的软琼脂成克隆能力分析

将 HeLa 细胞及用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基及 SFM-1~4 培养的、P3/P5/P10/P15 代 次的 MSCs 铺板于 6 孔盘,开展软琼脂克隆能力分 析,阴性对照组为溶剂对照。6 孔板接种细胞数分 别为每孔 300、500、1 000、2 000、5 000 个。过程 为:细胞准备、6 孔板铺下胶、铺上胶、补液(连续 培养 21 d)、NBT 染色和克隆形成观察。孔板置于 显微镜下观察,每组在镜下相对固定位置选择 4 个 视野拍照,标记视野中每个克隆的面积。细胞克隆 采用显微镜拍照、计数,用 OLYMPUS 荧光显微镜 图像处理软件计算每一个细胞克隆的面积,克隆面 积≥1 000 μm<sup>2</sup> 视为阳性克隆<sup>[4]</sup>。

#### 2.6 MSCs 的核型分析

将 HeLa 细胞及用含 10% FBS 的 DMEM/F-12

完全培养基及 SFM-1~4 培养的、P3/P5/P10/P15 代 次的 MSCs 用培养基调整细胞至 5×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 铺板于培养瓶,放置 37 ℃、5% CO2培养箱培养 48 h 后,加入质量浓度为 40 µg·mL<sup>-1</sup>的秋水仙素, 2 h 后常规制片、吉姆萨染色,最后使用染色体全自 动扫描仪进行扫描、分析。

#### 2.7 MSCs 的衰老及凋亡相关基因检测

细胞培养及 mRNA 提取操作同"2.4"项, qRT-PCR 检测 p53、p21、p16、p53 上调调亡调控 因子(PUMA)及内参基因(GAPDH)的 mRNA 表达。计算目标基因相较内参基因的相对表达量。 将 P3-MSCs-FBS 的(p53/p21/p16/PUMA)与 GAPDH 的相对表达量归一化为 1.0,比较不同条 件下培养的 MSCs 的待测基因的相对表达水平。 引物序列见表 1。

#### 2.8 数据处理

数据均采用 x ± s 表示, 使用 SPSS 21.0 软件分析, 采用配对 t 检验,

## 3 结果

## 3.1 MSCs 的分离及鉴定

采用组织贴壁法原代培养,可见成纤维状细胞 群落生长,见图 1-A,传代后,贴壁细胞均贴壁生 长,形态均一,呈纺锤状,见图 1-B。

P2 代的 MSCs 细胞, CD73、CD90、CD105 均 为阳性表达, CD14、CD34、CD45、CD19α、HLA-DR 均为阴性表达, 结果见表 2, 判定培养的细胞为 MSCs。

如图 2 所示, P2 代的 MSCs 在成骨诱导液中 逐渐变成不规则多边形,部分区域细胞聚集生长, 21 d 进行茜素红染色后在原细胞密集区可见红色钙 结节;在成脂细胞诱导液中逐渐变成短梭形,21 d 进行油红 O 染色后在细胞质中充满红色脂滴;在成 软骨细胞诱导液中逐渐聚拢成球形,21 d 进行阿利 辛蓝染色后在原细胞密集区可见蓝色软骨球。判定 MSCs 具有三系分化能立,培养的细胞为 MSCs。



A-原代培养 8 d; B-传代培养 48 h。 A-primary cultured cells for 8 d; B-cells subculture for 48 h.

图 1 hUC-MSCs 镜下观察图 (倒置显微镜, ×40)

Fig. 1 Microscopic observation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (inverted microscope, ×40)

表 2 流式检测结果

Table 2Flow identification

表面标志物	占比/%
CD73	99.6
CD90	99.9
CD105	100.0
CD14/CD34/CD45/CD79α/HLA-DR	0.1

## 3.2 MSCs 的生长状态及大小分析

不同培养条件下,用显微镜拍摄得到 P3/P5/P10/P15代的MSCs状态,见图3。其中,A~ E是MSCs铺板24h后的细胞状态,F是P3和P15 代的MSCs长满的状态。不同培养条件下,不同组



从上到下放大倍数依次为: ×100, ×200, ×100/40 Magnification from top to bottom is: ×100, ×200, ×100/40

## 图 2 MSCs 的诱导分化能力鉴定 Fig. 2 Identification of MSCs ability to induce differentiation

别 MSCs 的直径结果见图 4-A。血清培养条件下, 细胞生长状态相对稳定,形态、大小稳定; SFM 培 养下,细胞形态和大小差别较大,P15 代的细胞形 态均出现衰老细胞的典型形态(大而扁平)。血清培 养条件下,细胞直径在 18.2~19.3 μm; SFM 培养 条件下,SFM-1 的 P3 的细胞直径最小,细胞直径 在 16.7~20.6 μm。

## 3.3 MSCs 的增殖能力分析

不同培养条件下 MSCs 的生长曲线见图 4-B~ F,联合细胞的生长状态(图 3)、细胞直径进行匹 配性分析,在血清培养条件下,细胞生长状态、大 小和增殖能力相对稳定; SFM 培养下,差别较大, 前期增殖速度快,细胞形态更小更细长,后期增殖 速度明显降低。

#### 3.4 MSCs 的端粒酶活性检测

TERT 是端粒酶活性的限速决定因子,为 RNA 依赖的 DNA 聚合酶,在维持细胞永生化中起重要 作用<sup>[5]</sup>。*TERT* 的 mRNA 表达是判断细胞致瘤性的



A~E-MSCs 铺板 24 h 后的细胞状态; F-P3 和 P15 代的 MSCs 长满的状态。

A-E-cell states of MSCs after 24 h of plate laying; F-state of full growth of MSCs in P3 and P15 generations.

图 3 不同条件、不同代次 MSCs 的形态 (×40)





图 4 不同条件、不同代次 MSCs 的直径(A)、生长曲线(B~F)对比

Fig. 4 Comparison of diameter (A), growth curve (B—F) of MSCs under different conditions and different generations

指标之一<sup>[6]</sup>。对不同细胞 cDNA 中 *TERT* 进行分析, 结果见图 5, MSCs 均具有一定 *TERT* 的 mRNA 表 达,以维持细胞的自我更新能力;在血清培养下 MSCs 中 *TERT* 的 mRNA 表达相对稳定,随着细胞 传代扩增,呈现先增高后降低的趋势,在 P10 表达 最高; SFM 培养下不同代次之间 MSCs 中 *TERT* 的 表达量差异明显,与同代次 FBS 培养条件比较,P3、 P5 代中各 SFM 培养条件下 *TERT* 的表达量均显著 升高 (*P*<0.01、0.001); P10 代中 SFM-3、SFM-4, P15 代中 SFM-4 培养条件下 *TERT* 的表达量均显著 升高 (*P*<0.05、0.01)。P5-MSCs-SFM-1 中 *TERT* 的 相对表达量最高,是 HeLa 细胞的 1.74 倍。





#### 3.5 MSCs 克隆形成能力分析

锚定非依赖性生长是转化细胞独立于固体表 面生长的能力,细胞在琼脂内非锚定性生长是恶性 肿瘤细胞的重要特性之一,软琼脂克隆形成实验是 研究体外研究细胞恶性转化的金标准<sup>[7]</sup>。

分别对不同细胞的克隆形成面积进行分析,通 过软琼脂克隆实验的结果可以看出,阴性对照组 (溶剂对照)无克隆形成,阳性对照组 HeLa 具有 成克隆的特性。统计结果见图 6,代表性染色图像 见图 7。结果显示,血清培养/SFM-2/3/4 培养的不 同代次 MSCs 在不同铺板浓度下,均无阳性克隆形 成;SFM-1 培养的 P5 代的 MSCs 在 300 和 600 每 孔铺板条件下,有阳性克隆形成,克隆计数分别为 2、7个,平均面积为1311、1169.5 μm<sup>2</sup>。SFM-4 培 养的 MSCs 虽无阳性克隆的形成,但均有较多较大 面积的克隆形成,面积在 500~1000 μm<sup>2</sup>。

## 3.6 MSCs 核型分析

参考正常中国人体细胞的G显带带型标准,染

色体数量应为46XX或46XY,染色体结构无缺失、 重复、倒位、异位。结果显示,各条件MSCs细胞 的核型中均未发现明显的结构染色体异常或畸变, 表明其核型是稳定的。代表性核型分析结果见图8。

## 3.7 MSCs 衰老及凋亡基因检测分析

细胞衰老能够阻止含有受损 DNA 的细胞复制,是一种重要的抗肿瘤功能。衰老通常由损伤性刺激引起,包括端粒缩短(复制衰老)、DNA 损伤(DNA 损伤诱导衰老)和致癌信号转导(癌基因诱导衰老)<sup>[8-9]</sup>。稳定的细胞周期停滞是衰老的一个定义性特征。p53、p21、p16 是公认的细胞衰老标志,经常在衰老细胞中积累,以建立和维持衰老相关的生长停滞<sup>[10-11]</sup>。PUMA 是受 p53 调控的促凋亡因子,可调节衰老细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。

图 9 结果显示,无论是血清培养还是 SFM 培养,随着细胞扩增,衰老因子及促凋亡因子表达均有不同程度的升高。与含血清培养的 P3 相比,含血清培养条件下, p53、p21、p16、PUMA 在 P15 代均



图 6 不同细胞在软琼脂中形成克隆面积 Fig. 6 Clone areas of different cells forming clones in soft agar



图 7 不同细胞在软琼脂中形成克隆的代表性图像 Fig. 7 Representative image of different cells forming clones in soft agar

显著性增高 (*P*<0.001); 与血清培养的相应代次相 比, SFM 培养下, *p53、p21、p16、PUMA* 在 P10 代 均发生显著性增高 (*P*<0.001)。结果表明, 含血清 培养的 MSCs 更稳定。

4 讨论

MSCs 生产工艺一般包括:供者组织获取、细



上面为 G 带分析图,下面为自然分布图。

The above is the G-band analysis diagram, and the below is the natural distribution diagram.



图 9 不同培养条件下 MSCs 的衰老相关基因的相对表达量

Fig. 9 Relative expression levels of aging-related genes in MSCs under different culture conditions

胞分离、细胞扩增培养和细胞冻存等步骤,经过系统的工艺开发、验证,形成标准操作规程。细胞传 代次数、细胞培养添加物等工艺参数均影响着 MSCs 产品的质量。控制 MSCs 安全有效的关键是 有一个定义明确和充分控制的生产工艺<sup>[13]</sup>。 含 FBS 的培养基是 MSCs 前期研究中最常用 的培养基,MSCs 安全性和有效性的资料大都是在 此培养条件下得到的。在MSCs临床转化或药物开 发过程中,许多国内外干细胞研发机构在进行培养 基的更新选择。虽然无血清培养在很大程度上避免 了含血清培养的缺陷,但近年来,陆续发现某些 SFM 可促使 MSCs 出现软琼脂克隆形成阳性,提示 其致瘤性风险可能有所增大<sup>[4]</sup>。SFM 常会添加多种 促进细胞增殖的细胞生长因子,据文献报道<sup>[4]</sup>,一 般表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)和血小板源性生长因子(PDGF-BB)是主 要添加成分。其中,bFGF、PDGF 均可促使二倍体 成纤维细胞发生锚定非依赖性生长,其中 PDGF-D 甚至促使成纤维细胞发生显著恶性转化。

本研究中,细胞形态及增殖结果显示,在血清 培养条件下,细胞生长状态、大小和增殖能力相对 稳定; SFM 培养下, 细胞生长状态、大小和增殖能 力差别较大,前期增殖速度快,细胞形态更小更细 长,后期增殖速度明显降低;端粒酶检测结果显示, 在血清培养下 MSC 中 TERT 的 mRNA 表达相对稳 定,在无血清培养下 MSCs 中 TERT 的表达量差异 明显, P5-MSC-SFM-1 中 TERT 的相对表达量最高, 是阳性 HeLa 细胞的 1.74 倍, 较 P5-MSCs-FBS 发 生显著性增高; 软琼脂克隆检测结果显示, 血清 /SFM-2/3/4 培养的不同代次 MSCs 均无阳性克隆形 成; SFM-1 培养的 P5 代 MSCs 在每孔 300、600 个 铺板条件下,有阳性克隆形成;与血清培养条件相 比, 无血清培养下, p53、p21、p16、PUMA 在 P10 代均发生显著性增高;但各条件 MSC 细胞的核型 中均未发现染色体异常或畸变,表明核型均是稳定 的。结果表明,与无血清培养相比,传统血清培养 的 MSCs 具有较高的生长稳定性和较高的生物安全 性,体外长期培养不增加致瘤性风险;市面在售的 SFM,虽然成分明确,无动物源过敏原,但存在生 长不稳定特点,且个别 SFM 可能存在一定的安全 风险。虽 MSCs 细胞的长期体外扩张会导致衰老, P16、P21 表达升高来阻断细胞周期并维持生长停 滞,但仍然很难正式排除细胞转化的风险,因为脱 氧核糖核酸损伤被认为是肿瘤形成的一个中心过 程<sup>[9]</sup>。因此,对于 MSCs 细胞的生产工艺,需要通 过长期培养迫使细胞样本衰老,并对细胞的遗传和 增殖稳定性及安全性进行验证,以获得最佳且安全 的培养工艺。

本研究结果提示,虽 SFM 在很大程度上避免

了含血清培养的缺陷,但目前仍存在一定的风险,仍需引起细胞研发及生产机构的重视。细胞研发及 生产机构的 MSCs 生产工艺一要做好工艺稳定性、 生物安全性及有效性验证,以保证 MSCs 质量稳定、 有效且安全。

#### 利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- Romanov Y A, Svintsitskaya V A, Smirnov V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 105-110.
- Wang H S, Hung S C, Peng S T, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord [J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1330-1337.
- [3] 卢加琪,韦薇,刘伯宁,等. 间充质干细胞的研究进展与药学评价 [J]. 药学学报, 2019, 54(7): 1317-1324.

Lu J Q, Wei W, Liu B N, et al. Research progress, chemistry, manufacturing and controls considerations of mesenchymal stem cell products [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(7): 1317-1324.

- [4] 张可华, 贾春翠, 吴雪伶, 等. 培养基中细胞生长因子 增强人间充质干细胞成瘤性风险 [J]. 中国医药生物 技术, 2021, 16(6): 481-491.
  Zhang K H, Jia C C, Wu X L, et al. Growth factors in a culture medium may enhance tumorigenic potency of human mesenchymal stem cells [J]. Chin Med Biotechnol, 2021, 16(6): 481-491.
- [5] Stampfer M R, Yaswen P. Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2003, 194(2): 199-208.
- [6] 王皓莉,周建文,彭娅娅,等.采用优化 TRAP 方法检测乳腺癌细胞系中端粒酶活性 [J].中国卫生检验杂志,2021,31(11):1296-1299.
  Wang H L, Zhou J W, Peng Y Y, et al. Detection of telomerase activity in breast cancer cell lines using optimized TRAP method [J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(11): 1296-1299.
- Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, et al. The soft agar colony formation assay [J]. J Vis Exp, 2014(92): e51998.
- [8] Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic

opportunities [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 75-95.

- [9] Roos W P, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(9): 440-450.
- [10] Cheng Y, Lin K H, Young T H, et al. The influence of fibroblast growth factor 2 on the senescence of human adipose-derived mesenchymal stem cells during longterm culture [J]. Stem Cells Transl Med, 2020, 9(4): 518-530.
- [11] Insinga A, Cicalese A, Faretta M, et al. DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces

symmetric self-renewing divisions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(10): 3931-3936.

- [12] 杜文静. p53 蛋白在细胞凋亡中的作用机制研究 [D]. 合肥:中国科学技术大学, 2008.
  Du W J. Research on the mechanism of p53 protein in apoptosis [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2008.
- [13] Sato Y, Bando H, Di Piazza M, et al. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider [J]. Cytotherapy, 2019, 21(11): 1095-1111.

[责任编辑 兰新新]