

基于转录组数据探讨含血清和无血清培养条件对间充质干细胞生物特征的影响

王丽波¹, 孙英辉^{1,2}, 慈小燕^{1,2*}, 刘 荣^{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** 基于转录组学探讨含胎牛血清 (FBS) 培养基、无血清培养基 (SFM) 培养间充质干细胞 (MSCs) 生物学活性带来的差异。**方法** 从 3 例产妇脐带制备人脐带 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 连续培养 MSCs, 取 P4 代用转录组测序, 开展全局转录组谱分析, 进行细胞的基因表达差异分析, 使用 DAVID 对差异表达的基因进行基因本体 (GO) 功能富集分析; 使用 R 包 clusterProfiler 的 GSEA 函数进行基因集富集分析以探索通路的功能变化。提取 3 个批次的 FBS 组、SFM 组的 P4 代 MSCs mRNA, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法对转录组学的差异基因进行验证。**结果** 制备的 MSCs 经鉴定均符合要求; 转录组测序分析结果显示, 不同培养条件显著改变 MSCs 转录组情况, FBS 组高表达的代表性基因有趋化因子介导蛋白 1 (CXCL1)、白细胞介素 1 β (IL1 β)、G 蛋白耦联受体家族 C5 组成员 A (GPRC5A)、CUB 结构域含量蛋白 1 (CDCP1)、缓激肽 B1 受体 (BDKRB1), SFM 组高表达的代表性基因有 24-脱氢胆固醇还原酶 (DHCR24)、N-乙酰谷氨酸合成酶 (NAGS)、早幼粒细胞白血病锌指蛋白 (ZBTB16)、跨膜蛋白 119 (TMEM119)。SFM 培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在 DNA 复制、细胞增殖和代谢相关的生物过程, 而传统血清培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在细胞外基质矩阵、对细胞因子刺激的反应、对炎症反应及信号传导等具有生物功能性的生物过程。差异基因的 qRT-PCR 检测结果与转录组分析结果一致。**结论** MSCs 的基因表达会因培养基是否含血清而变化, 尽管 SFM 培养的 MSCs 展现了更强的增殖能力, 但 FBS 培养基培养的 MSCs 更具有生物功能性。

关键词: 间充质干细胞; 血清培养; 无血清培养; 生物特征; 转录组测序; 生物信息学

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)08-2204-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.014

Influence of serum and serum-free culture conditions on biological characteristics of mesenchymal stem cells based on transcriptome data

WANG Libo¹, SUN Yinghui^{1,2}, CI Xiaoyan^{1,2}, LIU Rong³, YAN Fengying^{1,2}

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. Department of Obstetrics, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To explore the differences in the biological activity of mesenchymal stem cells (MSCs) cultured in fetal bovine serum (FBS)-containing medium and serum-free medium (SFM) based on transcriptomics. **Methods** MSCs were isolated from the umbilical cords of three patients and identified by surface markers and tri-lineage differentiation. MSCs were continuously cultured in DMEM/F-12 complete medium containing 10% FBS and SFM. The fourth passage (P4) cells were subjected to transcriptome sequencing for global transcriptome profiling and differential gene expression analysis. DAVID was used for Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis of differentially expressed genes. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed using the

收稿日期: 2025-01-01

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项目 (24ZYCGCG00600)

作者简介: 王丽波 (1991—), 硕士研究生, 主要从事干细胞相关的生物信息学数据分析。E-mail: wanglibo@tipr.com.cn

***通信作者:** 慈小燕 (1987—), 副研究员, 主要从事干细胞研发。E-mail: cixy@tipr.com.cn

刘 荣 (1969—), 主任医师, 主要从事妇产科难治性疾病治疗。E-mail: liuronghch1999@sina.com

clusterProfiler R package to explore functional changes in pathways. The mRNA of P4 MSCs from three batches of FBS and SFM groups was extracted, and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to verify the differentially expressed genes identified by transcriptomics. **Results** The isolated MSCs met the requirements after identification. Transcriptome sequencing analysis showed that different culture conditions significantly altered the transcriptome of MSCs. Representative genes highly expressed in the FBS group included chemokine ligand 1 (*CXCL1*), interleukin 1 β (*IL1B*), G protein-coupled receptor family C group 5 member A (*GPRC5A*), CUB domain-containing protein 1 (*CDCP1*), and bradykinin B1 receptor (*BDKRB1*). Representative genes highly expressed in the SFM group included 24-dehydrocholesterol reductase (*DHCR24*), N-acetylglutamate synthase (*NAGS*), promyelocytic leukemia zinc finger protein (*ZBTB16*), and transmembrane protein 119 (*TMEM119*). Genes highly expressed in SFM-cultured MSCs were significantly enriched in biological processes related to DNA replication, cell proliferation, and metabolism, while genes highly expressed in FBS-cultured MSCs were significantly enriched in biological processes with biological functions such as extracellular matrix organization, response to cytokine stimulation, and inflammatory response and signal transduction. The qRT-PCR results of the differentially expressed genes were consistent with the transcriptome analysis results. **Conclusion** Analysis of transcriptome sequencing data showed that the gene expression of MSCs varied according to the medium. Although MSCs cultured in SFM showed stronger proliferation ability, MSCs cultured in FBS medium were more biologically functional.

Key words: mesenchymal stem cells; serum culture-medium; serum-free medium; biological characteristics; RNA-seq; bioinformation analysis

间充质干细胞 (MSCs) 作为一种新的“活”药物, 因其独特的免疫调控及组织修复等功能, 为大量传统医学难治性疾病带来了希望。许多生物技术公司对从临床级 MSCs 产品的开发到研究性新药 (IND) 的研究都投入了巨大的努力。MSCs 生产制造过程中不同培养基的选择, 是否对细胞的生物学特征产生影响, 进而影响其临床应用的有效性, 仍需进一步探索和验证。

支持 MSCs 生长的培养基对于 MSCs 的临床应用至关重要^[1-2], 其为细胞生长提供必要的环境, 并塑造细胞的表型和功能^[3-4]。2006 年国际细胞治疗学会 (ISCT) 提出, MSCs 应高表达 CD90、CD73 和 CD105, 而不表达 CD45、CD34 等标志物^[5]。然而, 尽管很多培养基培养的 MSCs 都符合这些标准, 但是却不足以定义用于临床疾病治疗的 MSCs 产品。不同培养基中产生的 MSCs 可能表现出活性、功能和其他特征的变化^[6], 这些差异可能对 MSCs 产品的开发具有重要意义, 甚至可能决定后续疾病治疗的效果。尽管使用血清培养的 MSCs 存在局限性, 包括潜在风险, 如未知的病毒污染、免疫反应和影响细胞批次稳定性, 但仍被许多公司使用^[7-9], 而与血清培养相比, 无血清培养是否能够稳定地支持 MSC 长期生长, 以及是否能表现出 MSCs 的生物活性, 缺乏系统的研究。

本研究分析和比较血清培养和无血清培养的 3 个个体来源的 MSCs 的整个转录组, 以提供不同培养条件下 MSCs 的详细转录组图谱, 并进行不同培

养条件下 MSCs 的转录组比较和特征分析, 一定程度上解释了它们之间生物学特性的差异, 旨在帮助 MSC 产品开发人员更深入地了解基础培养基的选择和优化会显著影响 MSCs 临床应用的发展。

1 材料

1.1 主要试剂

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

DMEM/F12 Basic 培养基、D-MEM/F-12 粉、TrypLE™ 酶、胎牛血清 (FBS)、PBS、DEPC 水、RNA 提取试剂盒 (Gibco 公司); 无血清培养基 (SFM, 友康恒业生物科技有限公司); 培养瓶、离心管、冻存管、移液管 (Corning 公司); 人 MSCs 表面标记检测试剂盒 (BD 公司); MSCs 诱导成脂、成骨、成软骨试剂盒 (BI 公司); NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 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 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (罗氏公司)。

2 方法

2.1 MSCs 的分离培养

将脐带组织切成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小的组织块, 贴于 T75 培养瓶底壁, 用 DMEM/F-12 培养液培养, 观察贴块周围贴壁细胞爬出情况, 细胞达 50% 融合时, 进行传代培养, 计为第 1 代细胞。共分离不同供者来源的 3 批次脐带用于研究, 分别编号为 G001、G002、G003。

2.2 MSCs 的鉴定

2.2.1 表面标志物鉴定 按照检测试剂盒说明书操作。以 TrypLE™ 酶消化收集 P2 代人脐带 MSCs, PBS 洗涤 3 次, 分装成每管 5×10^5 个细胞, 每种抗体加入 $20\text{ }\mu\text{L}$, 轻轻混匀细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min , 用染色缓冲液洗涤细胞 2 次, 用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 染色液重悬细胞, 流式细胞仪检测分析。

2.2.2 分化鉴定 分别用 TrypLE™ 酶消化收集 P2 代人脐带 MSCs, 铺板至孔板, 隔天更换诱导成脂、成骨、成软骨培养基, 诱导过程隔天换液, 培养箱中连续培养 21 d 后染色拍照。

2.3 MSCs 的培养

取分离到的 P2 代 MSCs, 分别用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基 (FBS 组)、友康 SFM (SFM 组) 连续培养。连续培养时, 每次以 1.5×10^4 个 $\cdot\text{cm}^{-2}$ 的密度接种, 当细胞融合率达到 85%~90% 时, 进行传代, 直至获得 P4 代不同培养条件下的 MSCs。

2.4 转录组测序文库构建、质控和测序

总 RNA 作为 RNA 样品制备的输入材料。将 3 个批次的 FBS 组、SFM 组的 P4 代 MSCs 接种至培养瓶, 细胞融合率达到 80%~90% 时, 加入 Trizol 收获总 RNA, 用于转录组测序。转录组测序委托北京诺禾致源科技股份有限公司 (<http://www.novogene.com>) 开展。使用 NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒, 按照说明书步骤和要求, 生成测序文库, 并添加索引以将序列归属到每个样品。该步骤的主要目的是使用 Oligo 磁珠从总 RNA 中纯化 mRNA。合格的文库根据所需的有效文库浓度和数据量, 利用 Illumina 平台进行 PE150 策略测序。

2.5 RNA-seq 生物信息学数据分析

对于 RNA-seq 数据的分析, 首先使用软件 fastp

(0.23.1)^[10] 对原始 reads 进行质控, 移除接头序列和低质量 reads。经过修剪的 reads 使用软件 STAR (2.7.8a)^[11] 比对到人类参考基因组 (hg38) 并且使用 GENCODE V35^[12] 进行注释和定量。使用 R 包 edgeR (3.42.4)^[13] 对不同分组的样本进行差异基因表达分析。将满足 FDR (矫正后的 *P* value) 小于 0.05 和 fold change 绝对值大于 1.5 的基因定义为差异表达的基因。使用 DAVID^[14] 对差异表达的基因进行基因本体 (GO) 功能富集分析。使用 R 包 GSVA^[15] 对 MSCs 样本进行基因集变异分析, 参考基因集来自于 MSigDb 数据库的 hallmark gene sets^[16], 认为矫正后的 *P* 值小于 0.05 具有统计学显著性。使用 R 包 clusterProfiler^[17] 的 GSEA 函数进行基因集富集分析以探索通路的功能变化。

2.6 RNA-seq 生物信息学数据验证

3 个批次的 FBS 组、SFM 组的 P4 代 MSCs 接种至培养瓶, 细胞融合率达到 80%~90% 时, 加入 Trizol 收获总 RNA, 提取 RNA, 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测差异基因及内参基因 (*GAPDH*) 的 mRNA 表达水平; 反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , 40 个循环, $60\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 熔解曲线分析。引物信息见表 1。比较不同组别 MSCs 中差异基因与内参基因的相对表达水平。

3 结果

3.1 MSCs 的分离和鉴定

分离获得 3 批次脐带来源的 MSCs, 均贴壁生长, 形态均一。P2 代的不同批次的 MSCs CD73、CD90、CD166、CD105、CD44 均为阳性表达, CD14、CD34R、CD45、CD19a、HLA-DR 均为阴性表达, 结果见表 2, 判定培养的细胞为 MSCs。

P2 代的不同批次的 MSCs, 诱导培养 21 d 后, 茜素红染色后在原细胞密集区可见红色钙结节, 油红 O 染色后在细胞质中充满红色脂滴, 番红 O 染色后在原细胞密集区可见橙红色软骨球, 判定具有三系分化能力。结果见图 1。

3.2 转录组数据分析

利用 RNA-seq 测序技术对 FBS 和 SFM 培养的 6 个 MSCs 样本 (MSC-1、MSC-2 和 MSC-3 为 FBS 培养的 3 个患者来源的 MSCs, MSC-4、MSC-5 和 MSC-6 为 SFM 培养的 3 个产妇来源的 MSCs) 进行了全局的转录组谱分析。根据 ISCT 标准, 为了评估 MSCs 质量控制的准确性, 在转录组数据中验

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>CXCL1</i>	AGCTTGCCTCAATCCTGCATCC	TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT
<i>IL1B</i>	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
<i>GPRC5A</i>	GCTATGGTGTGGAGAACAGAGC	GCAGCTGAAAAATGTGTGGAATAGG
<i>CDCP1-V1</i>	CAGGTGAAGCAGAACATCTCGG	GTCACCGTGAAAACGCCTTCCT
<i>CDCP1-V2</i>	CTCGACATCGTTGCCTACC	CGCTGATGGAGTGAGTGACTC
<i>BDKRB1-V1</i>	GACAATGCTCCAGAAGCCTGG	GCCAGGTAGATTTCTGCCACG
<i>BDKRB1-V2</i>	GTCCTGTTGGTCTTCCTCCTG	GTTGATGACACGGCAGAGAGGAG
<i>DHCR24</i>	CAGGAGAACCACTTCGTGGAAG	CCACATGCTTAAAGAACCACGGC
<i>NAGS</i>	CAGTTCAGACCTGCCATCACT	ATGTCCATGCGCTGCAAGAAGG
<i>ZBTB16-V1</i>	GCAGCTACATCTGCAGTGAGTG	TAGGGTTTCTCACCCGTGTGGA
<i>ZBTB16-V2</i>	TGAGTGTAAGCTCTGCCACCAG	CGTCTTCTCTATCCTCCAGTCG
<i>ZBTB16-V3</i>	CAGCTACATCTGCAGTGAGTGC	GGATGCGTTTGTGGCTCTTG
<i>ZBTB16-V4</i>	GTCTTCTGTCTGCTGTGTGGGA	AGCTGCCACAGAACTCACACTC
<i>ZBTB16-V5</i>	GAGCTTCCTGATAACGAGGCTG	AGCCGCAAACTATCCAGGAACC
<i>TMEM119</i>	GGATAGTGGACTTCTTCGCCCA	GGAAGGACGATGGGTAATAGGC
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

表 2 不同批次 MSCs 的流式检测结果

Table 2 Flow identification of different batches of mesenchymal stem cells

批次	阳性标志物/%			阴性标志物 (CD14、CD34、CD45、CD79α、HLA-DR) /%
	CD73	CD90	CD105	
G001	99.6	99.9	100.0	0.1
G002	99.8	99.7	99.3	0.2
G003	100.0	99.9	99.8	0.1

证了细胞对阳性 MSCs 标志物 (CD105、CD73、CD90 和 CD44) 的表达呈阳性, 并且几乎没有检测到阴性标志物 (CD45、CD34、CD19 和 HLA-DR) 的表达, 见图 2-A, 表明样本处理程序的准确性和测序数据的高质量, 并且与“3.1”项实验分析结果一致。

3.2.1 差异基因分析 为了进一步表征每个样本的功能特征, 进行了 GSVA 分析, 以确定每个样本的功能富集得分, 见图 2-B。热图展示了每个样本高表达的基因集, 发现 MSC-1、MSC-2 和 MSC-3 高表达参与免疫相关类别的基因, 并且有优越的血管生成潜力, 而这些基因的转录在 MSC-4、MSC-5 和 MSC-6 中受到限制, 并伴随着明显的细胞功能变化。众所周知, MSCs 具有分泌生长因子、分化为多种细胞、抗炎作用等特点, 这也是它在同种异

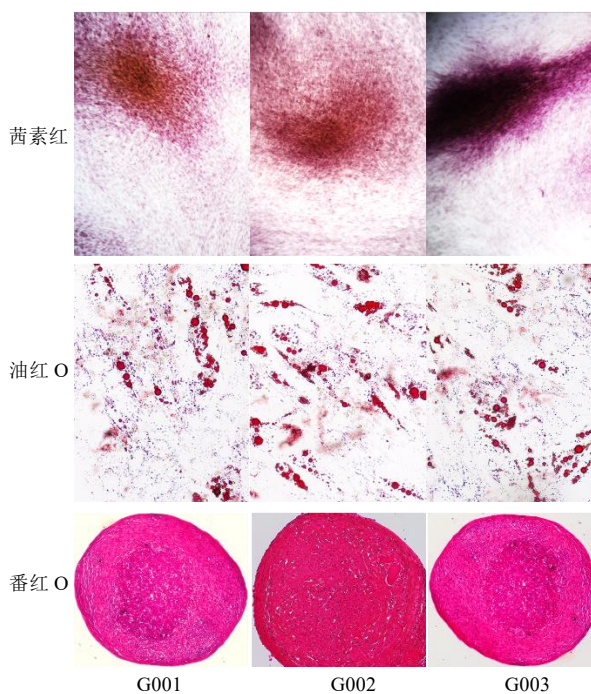


图 1 不同批次 MSC 诱导成骨的茜素红 (×100)、油红 O (×100)、番红 O (×40) 染色结果

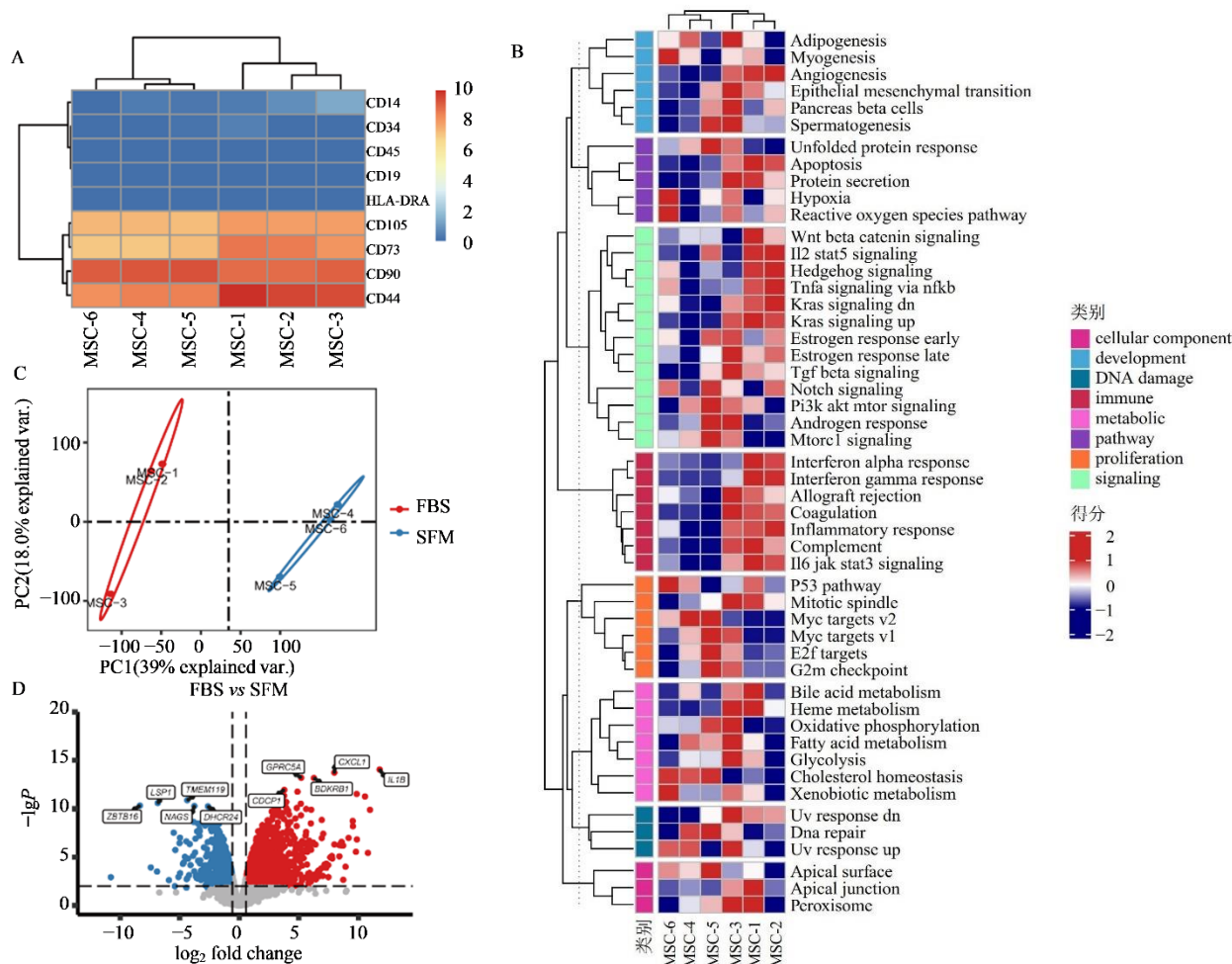
Fig. 1 Alizarin red (×100), oil red O (×100), safranin O (×40) staining results of induced osteogenesis from different batches MSCs

体细胞治疗中具有广泛应用前景的原因, 而这些特点在 FBS 培养的样本中明显得到更充分的表达, 例

如蛋白分泌通路、KRAS 信号通路。

主成分分析发现，来自 3 个不同供体的 MSCs 转录图谱根据 FBS 和 SFM 培养条件的不同分别聚在一起，见图 2-C，表明细胞产物之间的差异主要取决于不同的培养条件。在 2 种培养基培养条件

下，一共识识别到了 3 409 个差异表达基因 ($|\text{fold change}| > 1.5$, $\text{FDR} < 0.05$)，其中 FBS 培养基培养的 MSCs 高表达基因为 1 996 个，SFM 培养基培养的 MSCs 高表达基因为 1 413 个。火山图显示了 MSCs 在不同培养条件下差异表达的基因，见图 2-D。



A-MSCs 阳性标志物和阴性标志物在不同培养基培养的 MSCs 中的表达热图；B-不同培养基培养的 MSCs 通过 GSEA 计算的基因集富集得分热图；C-主成分分析（不同培养基培养的 MSCs 之间的转录本明显分离，每个点代表一个样本）；D-FBS 和 SFM 培养基培养的 MSCs 显著上调的基因火山图。

A-expression heatmap of MSCs positive and negative markers in MSCs cultured in different media; B-Heat map of gene set enrichment scores calculated by GSEA for MSCs cultured in different media; C- Principal component analysis (transcriptome separation between MSCs cultured in different media, with each point representing a sample); D- Volcano map of significantly upregulated genes in MSCs cultured in FBS and SFM media.

图 2 不同培养基培养的 MSCs 转录组分析

Fig. 2 Transcriptome of MSCs cultured in different medium

趋化因子介导蛋白 1 (CXCL1) 在 FBS 培养条件下显著上调，它作为一种趋化因子可以吸引白细胞向炎症部位迁移，在免疫反应中发挥重要作用^[18]。促炎细胞因子白细胞介素 1 β (IL1 β) 可以通过促进基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 的分泌，进而激活蛋白酶活化受体 1 (PAR1) 和 G 蛋白耦联信号通路，进而促进 MSCs 的迁移^[19]，G 蛋白耦联受体家族 C5

组成员 A (GPRC5A) 作为 G 蛋白耦联受体，与黏附调控通路之间有很强关联，敲低会减少细胞迁移和分化，此外有研究表明在烧伤模型中，GPRC5A 可能通过双模式作用机制（膜信号受体+核调控因子）协调伤口愈合，为开发促愈合疗法提供新思路^[20]。CUB 结构域含量蛋白 1 (CDCP1) 可能参与细胞黏附或与细胞外基质的相互作用^[21]，缓激肽 B1 受体

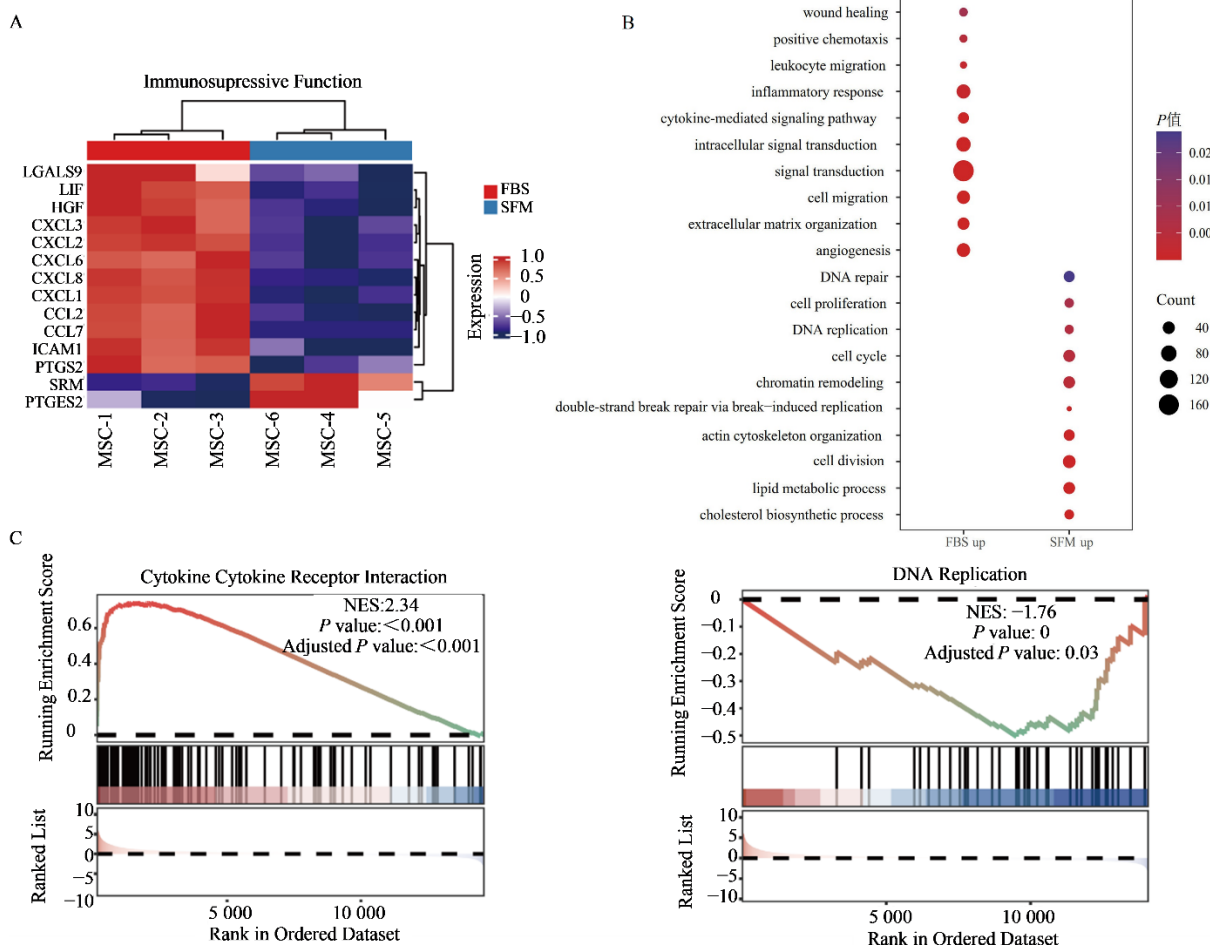
(*BDKRB1*) 是人体皮肤内激肽级联反应的关键组分,它通过促进 MMP-2/MMP-9 分泌与角质形成细胞分化,成为驱动皮肤伤口愈合的关键分子靶点^[22]。这 5 个基因都与炎症和免疫反应密切相关。

相比之下,24-脱氢胆固醇还原酶(*DHCR24*)等基因在 SFM 培养条件下显著上调,*DHCR24* 是胆固醇生物合成途径中的最终酶,催化去氢胆固醇中 $\Delta 24$ 双键的还原反应,生成胆固醇。*DHCR24* 参与多种细胞功能。与其在胆固醇生物合成中的作用相关,通过调节脂质筏的形成,从而促进信号转导和转运,还参与调节氧化应激、细胞分化等^[23]。*N*-乙酰谷氨酸合成酶(*NAGS*)是一种调节尿素循环的关键酶,通过维持 *N*-乙酰谷氨酸(*NAG*)水平,

间接稳定三羧酸循环(TCA)与尿素循环的耦联,提升 ATP 生成效率^[24]。早幼粒细胞白血病锌指蛋白(*ZBTB16*)基因启动子区域的 DNA 甲基化可能是控制 MSCs 成骨分化过程中基因表达的主要机制之一^[25]。研究表明,跨膜蛋白 119(*TMEM119*)被确定为一个骨诱导因子^[26]。这些基因可能参与维持 MSC 状态的稳定性、促进细胞增殖和分化。

3.2.2 功能分析 为了进一步展示不同培养条件对 MSCs 免疫功能的调节,用热图展示了与 MSCs 免疫抑制功能相关的基因集^[27]中的基因在 2 种培养条件下的表达情况,见图 3-A,很显然这些基因在 FBS 培养条件下展现出更高的表达水平。

为了探索在不同培养条件下这些差异表达基



A-免疫抑制功能基因集在两种培养基培养条件下的表达热图; B-不同分组差异表达基因上调的 GO 功能富集分析结果气泡图; C、D-2 个基因集的 GSEA 富集分析结果, 其中左侧代表 FBS 培养条件, 右侧代表 SFM 培养条件。

A-expression heatmap of immunosuppressive gene set under two different culture media conditions; B-Bubble plot of GO functional enrichment analysis results of upregulation of differentially expressed genes in different groups; C. The GSEA enrichment analysis results of D-2 gene sets, where the left side represents FBS culture conditions and the right side represents SFM culture conditions.

图 3 不同培养基培养的 MSCs 的转录组功能分析

Fig. 3 Transcriptome function analysis of MSCs cultured in different media

因的生物学特性,进行了基因功能富集分析以此来对基因进行功能注释。GO 分析结果表明,与 SFM 相比,FBS 培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在细胞外基质矩阵、炎症反应、细胞迁移、信号传导等生物过程,而 SFM 培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在 DNA 复制、细胞增殖、DNA 修复以及代谢相关的生物过程,见图 3-B。GSEA 分析结果表明对上述结果进一步验证,见图 3-C、D。

通过对转录组测序数据的分析,证明了 MSCs 基因表达会根据使用的培养基而变化,尽管 SFM 培养的 MSCs 现了更强的增殖能力,但是 FBS 培养的

MSC 展现了与生物学活性更强的相关性。

3.3 转录组数据验证

转录组数据分析结果中,FBS 组高表达的代表性基因有 *CXCL1*、*IL1B*、*GPRC5A*、*CDCP1*、*BDKRB1*,SFM 高表达的代表性基因有 *DHCR24*、*NAGS*、*ZBTB16* 和 *TMEM119*。这些差异基因中,*CDCP1* 和 *BDKRB1* 有 2 个转录变异体,*ZBTB16* 有 5 个转录变异体,检测时将变异体全部纳入检测,引物的具体信息见表 1。结果如图 4 所示,差异表达基因的相对表达量在 FBS 组与 SFM 组之间均有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),与生信分析结果一致。

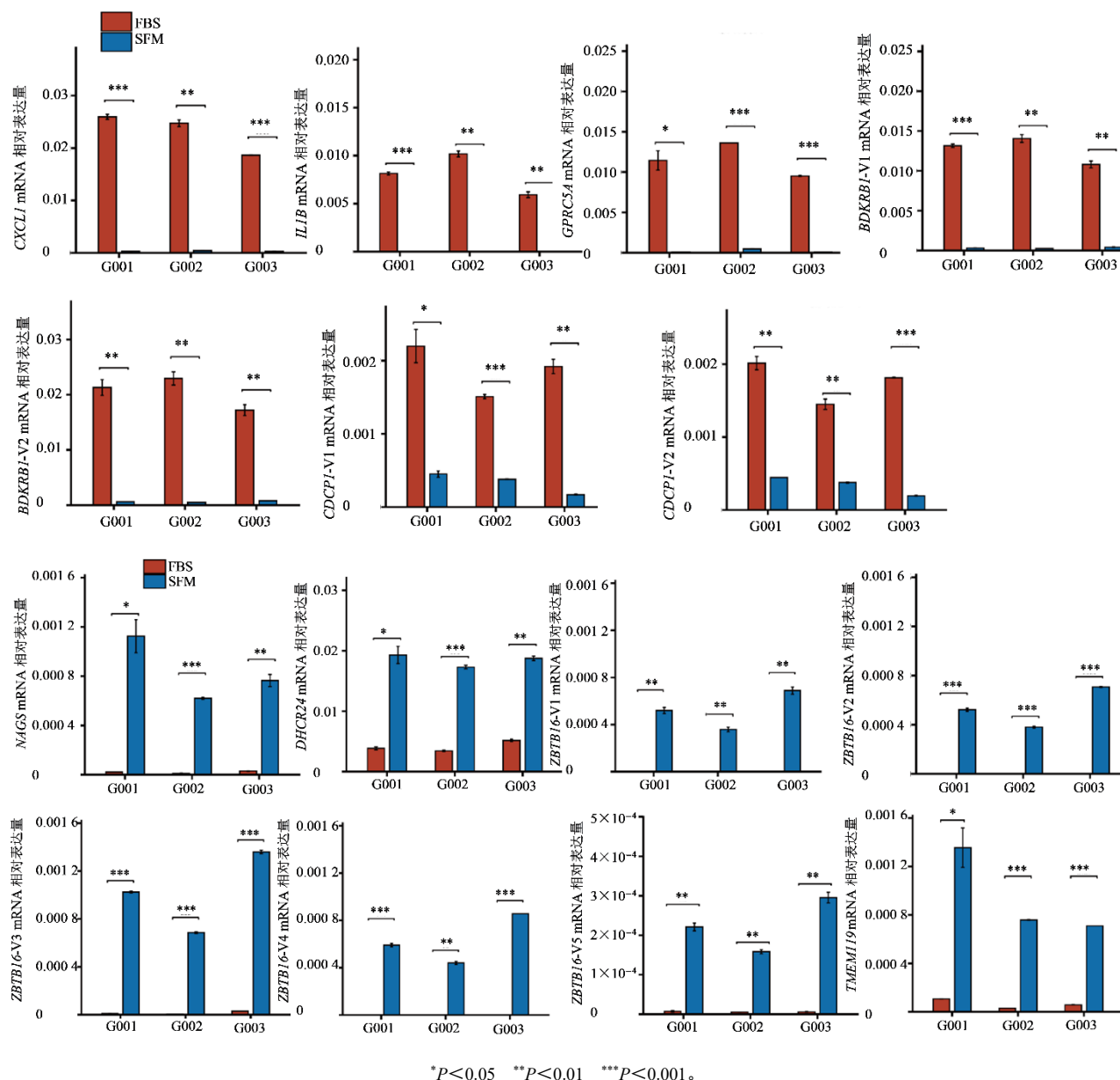


图 4 MSCs 中差异基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of significantly overexpressed differential genes in MSCs

4 讨论

含 FBS 的培养基是 MSCs 前期研究中最常用的培养基, MSCs 的基础研究资料大都是在此培养条件下得到。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,陆续有文献报道发现某些无血清培养基可改变 MSCs 的生物学特征,进而影响细胞的安全性和有效性。

本研究利用 bulk 转录组测序,对血清和无血清培养的细胞开展全局转录组谱分析,通过对细胞的基因表达差异分析来描绘细胞的生物学特性,并经过 qRT-PCR 的验证。结果显示,不同培养条件可显著改变 MSCs 转录组情况,无血清培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在增殖和代谢相关的生物过程;而血清培养的 MSCs 高表达的基因显著富集在细胞外基质矩阵、对细胞因子刺激的反应、对炎症反应及酶联受体信号通路等具有生物功能性的生物过程。细胞外基质组织是一个复杂的结构,由细胞分泌的一系列过程组成,它在细胞周围形成一个支持细胞的三维网络,并提供力学和信号传导,并且它还参与了许多生物过程,如免疫反应、血管生成等^[28]。对细胞因子刺激的反应指的是细胞在受到细胞因子刺激后做出的生物学反应。当细胞受到细胞因子的刺激时,它们会通过细胞表面的受体与细胞因子结合,并触发一系列细胞内信号传递的事件。这些信号传递事件可以导致细胞内的基因表达变化、蛋白质合成和修饰的改变,以及其他细胞功能的调节^[29]。而炎症反应是机体对外部刺激(如细菌感染、组织损伤等)做出的一种防御性反应。炎症反应通常涉及多个细胞类型和分子交互作用,以清除病原体、修复受损组织并促进免疫应答^[30]。

本研究基于不同培养条件下全局转录组谱数数据分析发现,相较于 SFM, FBS 培养的 MSCs 更具有生物功能性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bui H T H, Nguyen L T, Than U T T. Influences of xeno-free media on mesenchymal stem cell expansion for clinical application [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(1): 15-23.
- [2] Agostini F, Vicinanza C, Lombardi E, et al. *Ex vivo* expansion in a clinical grade medium, containing growth factors from human platelets, enhances migration capacity of adipose stem cells [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:

1404228.

- [3] Winkel A, Jaimes Y, Melzer C, et al. Cell culture media notably influence properties of human mesenchymal stroma/stem-like cells from different tissues [J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(11): 653-668.
- [4] Nagasaki K, Nakashima A, Tamura R, et al. Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental peritoneal fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 203.
- [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] Czapla J, Matuszczak S, Kulik K, et al. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 235.
- [7] Piletz J E, Drivon J, Eisenga J, et al. Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum [J]. *Cell Med*, 2018, 10: 2155179018755140.
- [8] Selvaggi T A, Walker R E, Fleisher T A. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions [J]. *Blood*, 1997, 89(3): 776-779.
- [9] Tuschong L, Soenen S L, Blaese R M, et al. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(13): 1605-1610.
- [10] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [11] Dobin A, Davis C A, Schlesinger F, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15-21.
- [12] Frankish A, Diekhans M, Ferreira A M, et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D766-D773.
- [13] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [14] Dennis G Jr, Sherman B T, Hosack D A, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): P3.
- [15] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7.

- [16] Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection [J]. *Cell Syst*, 2015, 1(6): 417-425.
- [17] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [18] Panda S K, Robinson N, Desiderio V. Decoding secret role of mesenchymal stem cells in regulating cancer stem cells and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(6): 189205.
- [19] Chen M S, Lin C Y, Chiu Y H, et al. IL-1 β -induced matrix metalloprotease-1 promotes mesenchymal stem cell migration via PAR1 and G-protein-coupled signaling pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3524759.
- [20] Chanteloube S, Ya C A, Le Provost G, et al. A noncanonical-GPRC5A signaling regulates keratinocyte adhesion and migration by nuclear translocation [J]. *FASEB J*, 2025, 39(2): e70323.
- [21] Zhang R R, Zheng Y W, Li B, et al. Hepatic stem cells with self-renewal and liver repopulation potential are harbored in CDCP1-positive subpopulations of human fetal liver cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 29.
- [22] Matus C E, Ehrenfeld P, Pavicic F, et al. Activation of the human keratinocyte B1 bradykinin receptor induces expression and secretion of metalloproteases 2 and 9 by transactivation of epidermal growth factor receptor [J]. *Exp Dermatol*, 2016, 25(9): 694-700.
- [23] Luu W, Zerenturk E J, Kristiana I, et al. Signaling regulates activity of DHCR24, the final enzyme in cholesterol synthesis [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(3): 410-420.
- [24] Shi D S, Allewell N M, Tuchman M. The N-acetylglutamate synthase family: Structures, function and mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 13004-13022.
- [25] Marofi F, Vahedi G, Solali S, et al. Gene expression of TWIST1 and ZBTB16 is regulated by methylation modifications during the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6230-6243.
- [26] Tanaka K I, Inoue Y, Hendy G N, et al. Interaction of Tmem119 and the bone morphogenetic protein pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells [J]. *Bone*, 2012, 51(1): 158-167.
- [27] Gao Y C, Chi Y, Chen Y F, et al. Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1 [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4373.
- [28] Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(12): 786-801.
- [29] Ray A. Cytokines and their role in health and disease: A brief overview [J]. *MOJ Immunol*, 2016, 4(2).
- [30] Turner M D, Nedjai B, Hurst T, et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2563-2582.

[责任编辑 兰新新]