

间充质干细胞建库和稳定性研究

张晓猛^{1,2}, 杜晓雪³, 陈羽¹

(1. 沈阳药科大学, 辽宁沈阳 110016; 2. 北京诺合天成洁净科技有限公司, 北京 102206;

3. 北京橡鑫生物科技有限公司, 北京 100176)

摘要: 间充质干细胞(MSCs)因具有自我复制与多向分化能力,在再生医学中前景广阔。但大部分制剂采用冻存工艺,对新鲜制剂研究较少。本次对新鲜制剂在2~8℃条件下的稳定性进行研究,为临床应用提供科学依据。样本来源脂肪组织,经胶原酶消化和离心获得高纯度细胞,利用红细胞裂解液清除杂质,经细胞计数后接种培养,最后添加冻存液制成种子细胞库备用。通过添加一定比例的复方电解质和人血白蛋白制备新鲜制剂,在2~8℃条件下,静置0、6、9 h,以研究其稳定性。研究结果显示:细胞表达CD90、CD105和CD73,不表达CD34和CD45,具有良好成脂、成骨分化能力且无菌。pH、成脂分化、成骨分化、细胞数量、细胞活率、流式表型、淋巴细胞增殖抑制结果均符合设定标准,9 h内细胞依然有良好的生物学活性。

关键词: 间充质干细胞;建库;制剂稳定性

MSCs广泛分布于人体多种组织中,如骨髓、脂肪组织、牙髓、皮肤成纤维细胞等^[1-2]。脂肪组织因易获得、采集便捷以及对供体影响小等优势,近年来成为研究热点,是获取MSCs的理想来源。在临床实践中,MSCs已有效支持造血干细胞移植,促进造血功能恢复,提高移植成功率。同时,MSCs具有免疫调节作用,有助于修复损伤组织^[3]。对于自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、硬皮病和炎症性肠病等,同样展现出了显著的疗效。特别是在治疗膝关节骨关节炎(OA)方面,因其能够分化为软骨细胞并有效控制关节炎症,成为研究的一大焦点。尽管MSCs在临床治疗中表现出了巨大的潜力,但关于其制剂稳定性的研究仍需进一步深入。

1 材料与方法

1.1 概述

遵循国家药品监督管理局药品审评中心在2023年发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技

术指导原则(试行)》^[4],稳定性研究已成为一项必要工作,内容包括代表性原液、成品和需要临时或阶段性冻存的工艺中间品^[5]。在进行研究时,应当参照生物制品稳定性研究的技术规范,如ICH Q5C指南。鉴于制剂的有效成分是活细胞,储存过程中的温度、时间及条件变化均可能对制剂的质量产生显著影响,包括细胞的状态、数量、活率、表面标记以及生物学活性等。在本研究中,对制剂在2~8℃储存条件下不同储存时间的稳定性进行了详细考察,旨在确保细胞在临床应用中的性能达标,为MSCs的临床应用提供坚实的科学基础和技术支持。

1.2 材料

1.2.1 试剂及设备

培养基(SCM015,默克公司)、人血白蛋白(华兰生物)、复方电解质注射液(四川科伦药业)、DMSO(默克公司)、0.1%明胶溶液(默克公司)、胰蛋白酶-EDTA消化液(默克公司)、T75细胞培养瓶(无锡耐思生物科技)、细胞计数器/细胞计数仪(美

作者简介:张晓猛,男,学士,研究方向:细胞治疗。

通信作者:陈羽,男,辽宁沈阳人,副教授,硕士生导师,博士,研究方向:细胞培养、治疗与作用机制。

国 Nexcelom)、流式细胞仪(BD 公司)、显微镜(徕卡)。

1.2.2 细胞建库

间充质干细胞(MSCs)的分离与培养:在无菌条件下,将脂肪组织经 70 μm 滤网去除杂质,离心收集细胞悬液。利用 AOPI 荧光计数法调整细胞密度,在完全培养基中进行初培养,并定期更换培养基以促进贴壁生长。之后,将细胞重悬于添加 FGF-2 的扩增培养基中,接种于预处理板,在 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养,定期更换培养基以促进细胞增殖。当细胞融合度至 80%时,用胰蛋白酶-EDTA 消化,按需密度接种新板,继续扩增或冻存,进行 5 次传代建立细胞库。

1.2.3 制剂和稳定性研究

取冻存细胞株进行复苏,采用 37 ℃水浴恢复细胞活力。在显微镜下观察细胞状态,应呈现纤维细胞样形态(纺锤形和梭形)贴壁生长,形态均一。在复苏时,细胞经 NaCl 注射液洗涤,离心去除冻存保护剂。荧光计数后,将细胞重悬于 0.5%~1.0%人血白蛋白的复方电解质注射液中,调整细胞终浓度为 1.0×10⁷ cells/mL。

将制剂储存在 2~8 ℃冰箱中,以模拟临床储存

条件。分别在 0、6、9 h 取样,进行包括外观、无菌、pH 及细胞功能(成脂、成骨分化)的检测,以及细胞数量、活率和表型(CD90、CD105、CD73 阳性,CD34、CD45 阴性),并检测其免疫调节功能。以评估在 0.5%~1.0%人血白蛋白复方电解质注射液保护下细胞功能与活性。

1.3 检测方法

外观检查:目视法,为澄清乳白色液体,无明显可见细胞聚团,与初始外观相比无明显变化。

无菌检测:按《中华人民共和国药典》2020 年第三部“薄膜过滤法”进行无菌检查。结果应为阴性。

细胞数和细胞活率:采用自动细胞计数仪,活率不低于 80%。

成骨分化:茜素红染色,显微镜观察呈现深红色。

成脂分化:油红 O 染色,显微镜下观察呈现红色。

流式表型:流式分析,阳性标记 CD73、CD90、CD105 表达应≥95.0%。

淋巴细胞增殖抑制:流式分析,抑制率应≥25%。

2 结果

三批制剂 2~8 ℃不同时间节点的结果详见表 1。

表 1 三批制剂 2~8 ℃不同时间节点的结果

批次	MSC-P001			MSC-P002			MSC-P003		
时间节点	0 h	6 h	9 h	0 h	6 h	9 h	0 h	6 h	9 h
外观	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
无菌	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
pH	6.60	6.52	6.51	6.60	6.56	6.55	6.59	6.57	6.54
成脂分化	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
成骨分化	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
细胞数量/(×10 ⁷ ·mL ⁻¹)	1.05	1.06	1.05	1.05	1.02	0.97	1.04	1.02	1.02
细胞活率/%	96.21	94.52	94.46	96.40	94.92	94.46	95.36	93.10	93.13
CD34、CD45 表达率/%	0.2	0.3	1.8	0.4	0.2	0.7	0.7	0.3	0.3
CD73 表达率/%	99.5	99.4	98.6	99.6	99.7	99.6	99.3	99.7	99.8
CD90 表达率/%	99.8	99.6	98.6	99.8	99.9	99.5	99.4	99.7	99.8
CD105 表达率/%	99.5	99.2	98.5	99.7	99.8	99.3	99.3	99.7	99.8
淋巴细胞增殖抑制/%	81.39	56.02	55.69	61.13	59.50	60.00	91.83	62.26	48.80

三批次细胞在 2~8 ℃ 储存后,初始活率近 100%,显示良好起始状态。随时间推移,各批次活率虽有下降,但最高仅降 3.11%,仍保持高活性(图 1a)。细胞数量稳定,无菌且形态正常,具备成骨与成脂分化能力,均符合实验标准,表明储存条件有效维护了细胞性能,适合进一步研究。

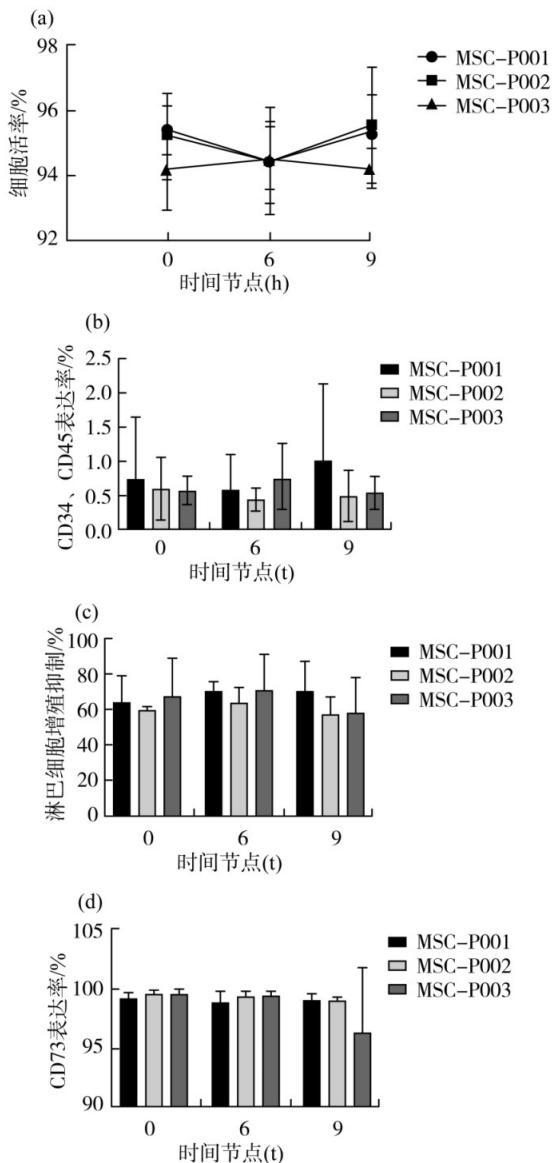


图1 制剂稳定性表征

(a) 细胞活率; (b) CD34、CD45 表达率;
(c) 淋巴细胞增殖抑制; (d) CD73 表达率

三个批次 MSCs 在 0、6、9 h 检测中,CD34 与 CD45 表达极低且无显著变化,表明细胞未分化为造血细胞,维持了原细胞特性(图 1b)。同时,CD73、CD90、CD105 等特异性标记物表达稳定,尤其是 CD73 与 CD90、CD105 虽有波动但总体一致,

显示 MSCs 纯度和生物学活性得以保持(图 1d)。此外,MSCs 显著抑制淋巴细胞增殖,且随时间延长抑制率略增,暗示其免疫调节功能可能有所增强,具体机制待深入探究(图 1c)。

综上,三批次 MSCs(MSC-P001、MSC-P002、MSC-P003)在 2~8 ℃ 下,细胞数量稳定,活率超 80%,表面标记 CD73、CD90、CD105 高表达(>95%),CD34、CD45 低表达,符合 ISCT 标准。同时,细胞具备成骨、成脂分化能力及高淋巴细胞增殖抑制率,显示其良好的分化与免疫调节功能。

3 讨论

MSCs 稳定性研究是明确其药品储存条件与有效期的基础,细胞生物学活性直接影响临床应用效果。本研究采用含 0.5%~1.0% 人血白蛋白的复方电解质注射液作为保护剂,发现三批次 MSCs 在体外保存 9 h 内稳定性良好。尽管活性略有下降,但关键表面标记物 CD73、CD90、CD105 高表达,且淋巴细胞增殖抑制能力持续,支持临床即时应用。然而,保存条件对 MSCs 活性影响显著,未来需深入探索不同条件(温度、培养基、气体环境)下的稳定性,以优化保存方法,延长保存期限。在细胞制剂开发过程中,需全面考察储存、运输、使用的稳定性,确保临床应用安全,为临床转化奠定坚实的科学和技术基础。

参考文献:

- [1] ZHOU J, SHI Y F. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Origin, immune regulation, and clinical applications[J]. Cell Mol. Immunol. 2023(20): 555–557.
- [2] BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential[J]. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2019(13): 1738–1755.
- [3] 沈甜甜,方翼. 间充质干细胞的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2019(35): 2939–2942.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》[EB/OL]. 2023.
- [5] 储王龙,李童婧,上官燕,等. 人脐带间充质干细胞制剂大规模生产中稳定性研究[J]. 药学学报, 2024(59): 743–750.