

DOI:10.19803/j.1672-8629.20250916 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1672-8629 (2026) 02-0121-06

## 端粒酶活性检测 RQ-TRAP 方法学验证及在间充质干细胞检测评价中的应用研究

张真<sup>1,2</sup>, 喻谢安<sup>1,2</sup>, 许淳淇<sup>1,2</sup>, 陈宁<sup>1,2</sup>, 秦美蓉<sup>1,2\*</sup>, 王平<sup>1,2#</sup> (1 深圳市药品检验研究院药理毒理室, 广东 深圳 518000; 2 广东省细胞与基因治疗创新药物物质控工程技术研究中心, 广东 深圳 518000)

**摘要:** 目的 验证实时定量端粒酶重复扩增方法 (Real-Time Quantitative Telomerase Repeat Amplification Protocol, RQ-TRAP) 的方法学性能, 包括专属性、准确性、精密度、线性、扩增效率、定量下限 (Lower Limit of Quantification, LLOQ), 并将其应用于人源间充质干细胞 (Human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 的端粒酶活性检测评价, 以评估 hMSCs 的增殖潜能、衰老进程及潜在肿瘤转化风险, 为再生医学中的细胞疗法提供标准化检测手段。方法 采用 RQ-TRAP 方法对 hMSCs 进行端粒酶活性检测。hMSCs 来源于人脐带, 培养于 MEM- $\alpha$  培养液中。样品制备包括细胞裂解提取, RQ-TRAP 体系使用 TRAP Reaction Buffer 等试剂, 荧光定量聚合酶链式反应仪进行绝对定量检测。方法学验证使用 TSR8 标准品进行专属性、准确性 (回收率)、中间精密度 (RSD)、线性 ( $R^2$  和扩增效率) 和 LLOQ (回收率置信区间) 评估。hMSCs 检测包括标准曲线拟合和 Ct 值计算端粒酶活性。结果 方法学验证显示专属性良好, 无热灭活细胞基质干扰; 准确性回收率 95% 置信区间为 91.37%~111.0% (符合 75%~125%); 中间精密度 RSD 均 <25%; 线性  $R^2 > 0.99$ , 扩增效率 104.1% (90%~110%); LLOQ 为 0.2 TPG Units (回收率置信区间 70%~130%)。hMSCs 端粒酶活性为 1.432 TPG/万个细胞, 标准曲线扩增效率 102.6%。结论 RQ-TRAP 方法经验证可靠、灵敏, 适用于 hMSCs 端粒酶活性定量检测, 可有效评估细胞衰老和肿瘤风险。该方法填补 hMSCs 标准化检测空白, 支持再生医学安全应用。

**关键词:** 端粒酶活性; 间充质干细胞; 成瘤性检测; 荧光定量 PCR; 方法学验证

### Methodological Validation of RQ-TRAP for Telomerase Activity Detection and Its Applications in Human Mesenchymal Stem Cells

ZHANG Zhen<sup>1,2</sup>, YU Xie'an<sup>1,2</sup>, XU Chunqi<sup>1,2</sup>, CHEN Ning<sup>1,2</sup>, QIN Meirong<sup>1,2\*</sup>, WANG Ping<sup>1,2#</sup> (1 Department of Pharmacology and Toxicology, Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen Guangdong 518000, China; 2 Guangdong Engineering Technology Research Center for Quality Control of Cell and Gene Therapy Products, Shenzhen Guangdong 518000, China)

**Abstract: Objective** To validate the methodological performance of the real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol (RQ-TRAP), including the specificity, accuracy, precision, linearity, amplification efficiency, and lower limit of quantification, and detect telomerase activity in human mesenchymal stem cells (hMSCs) using this method in order to assess the proliferative potential, senescence process, and potential tumorigenic risk of hMSCs. **Methods** Telomerase activity in hMSCs was detected using the RQ-TRAP method. hMSCs derived from human umbilical cords were cultured in MEM- $\alpha$  medium. Samples were prepared via cell lysis and extraction, and absolute quantification was performed on a real-time polymerase chain reaction system using TRAP reaction buffer. Methodological validation was conducted using TSR8 control templates to evaluate the specificity, accuracy (recovery rate), intermediate precision (RSD), linearity ( $R^2$  and amplification efficiency), and LLOQ (confidence interval of recovery). For hMSCs assessment, telomerase activity was calculated based on standard curve fitting and Ct values. **Results** Methodological validation results indicated a good specificity with no interference from heat-inactivated cell matrices. The 95% confidence interval (CI) for accuracy recovery ranged from 91.37% to 111.0% (meeting the standard of 75%–125%). The intermediate precision (RSD) was less than 25% for all samples. Linearity assessment showed an  $R^2 > 0.99$  with an amplification efficiency of 104.1% (within the 90%–110% range). The LLOQ was determined to be 0.2 TPG Units (recovery CI: 70%–130%). The telomerase activity in hMSCs was measured at 1.432 TPG per 10 000 cells and the amplification efficiency of the standard curve in this assay was 102.6%. **Conclusion** The RQ-TRAP method

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (82104357)。

**作者简介:** 张真, 男, 博士, 副主任药师, 先进治疗药品检测评价。

\* **通信作者:** 秦美蓉, 女, 硕士, 主任药师, 传统药品与先进治疗药品检测评价。E-mail: szqinmeirong@sina.com

# 为共同通信作者。

has proved to be reliable and sensitive, which can be used for quantitative detection of telomerase activity in hMSCs and for effective assessment of cell senescence and tumorigenic risks. This method fills the gap in standardized testing for hMSCs and supports safe applications of regenerative medicine.

**Keywords:** Telomerase Activity; Mesenchymal Stem Cells; Methodological Validation; Real-time Quantitative PCR; Tumorigenicity Assessment

端粒酶活性检测作为评估细胞增殖潜能、衰老进程及肿瘤转化风险的核心工具,已在干细胞生物学和再生医学领域扮演关键角色<sup>[1]</sup>。传统端粒酶检测方法,如经典的端粒酶重复扩增流程(Telomerase Repeat Amplification Protocol, TRAP),虽奠定方法学基础<sup>[2]</sup>,但受限于半定量性质、假阳性扩增及低灵敏度,无法满足现代高通量且精确的检验需求<sup>[3]</sup>。近年来,随着实时荧光定量技术的成熟,实时定量检测TRAP(Real-Time Quantitative TRAP, RQ-TRAP)的方法应运而生。该方法通过荧光报告基因实时监测端粒重复序列扩增过程,实现端粒酶活性的精确定量,灵敏度大幅提升且显著降低背景噪音和变异系数<sup>[4]</sup>。RQ-TRAP凭借无需放射性标记、兼容微量样本、并可整合多重探针实现特异性增强等优势,已被广泛用于低表达样本,如人源间充质干细胞(Human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs)等的评价与检验<sup>[5]</sup>。

hMSCs作为多能前体细胞,以其免疫调节、分化潜能及低免疫原性而在再生医学中备受青睐<sup>[6]</sup>。2015年以来,hMSCs的应用场景已从经典的骨髓/脂肪移植,扩展至涵盖多种疾病的细胞疗法等领域,如骨质疏松、心血管疾病、自身免疫病及神经退行性疾病等<sup>[7]</sup>。hMSCs应用潜力的拓宽,不仅依赖于血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)等分泌因子的旁分泌效应<sup>[8]</sup>,更得益于人端粒酶逆转录酶(Human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT)过表达等工程化策略对其治疗效能的永生化优化与增强<sup>[9]</sup>。在此背景下,基于hMSCs的新药研发浪潮涌现,许多创新疗法,例如嵌合抗原受体修饰的hMSCs(Chimeric Antigen Receptor-Mesenchymal Stem Cell, CAR-hMSCs)靶向疗法、纳米负载外泌体递送系统,以及过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, PPAR $\gamma$ )激动剂等小分子调控剂,正从实验室向新药临床试验申请(Investigational New Drug, IND)阶段推进<sup>[10]</sup>。然而,随着应用的不断深化,hMSCs的潜在安全风险日益凸显,尤其是成瘤性风险<sup>[11]</sup>。hMSCs在体外扩增过程中易发生端粒缩短、遗传不稳定及表观遗传重编程,端粒酶

活性异常升高往往预示染色体异常或恶性转化<sup>[12]</sup>。

从发生机制上讲,正常hMSCs的hTERT基因通常受到多层次的表观遗传调控(如启动子甲基化或抑制性组蛋白修饰),整体表现为低水平或不可检测的端粒酶活性,这被认为是限制其持续增殖潜能、防止异常增殖的重要安全屏障。然而,在体外长期扩增或基因修饰等应激条件下,细胞可能出现遗传或表观遗传状态的改变,部分情况下可伴随hTERT启动子区域的异常调控或表观遗传去抑制,导致端粒酶活性发生异常“重新激活”(Re-Activation)。这种获得性的端粒酶活性升高,使细胞能够突破海弗里克极限,获得永生化潜能,进而显著增加其成瘤风险。因此,端粒酶活性异常升高常被视为细胞发生恶性转化的重要分子标志之一<sup>[13]</sup>。通过RQ-TRAP对端粒酶活性进行持续、定量监控,本质上是在对细胞是否突破上述安全屏障进行功能层面的评估,其作为一种重要且功能相关的生物学指标,可用于支持细胞制品遗传稳定性及潜在成瘤性风险(Tumorigenicity)的综合评价,符合监管机构对细胞产品安全性评估的基本要求<sup>[14]</sup>。

因此,本研究聚焦RQ-TRAP方法学验证及其在hMSCs检测评价中的应用,旨在填补标准化空白,为安全高效的再生策略提供检测评价手段与科学支撑,保障患者用药安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

hMSCs(人脐带来源,获赠于深圳市南山区人民医院)。细胞培养条件为37°C,5% CO<sub>2</sub>。

### 1.2 主要试剂及仪器

荧光定量聚合酶链反应(Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)仪(美国ABI公司,型号:Viia7); MEM- $\alpha$ 培养液(美国Gibco公司,批号2302007); TRAP qPCR Reaction Buffer(批号:20250301)、TRAP qPCR Reaction Enzyme(批号:20250301)、TRAP Primer & Control MIX(批号:20250301)、TRAP qPCR Reaction Replenisher(批号:20250301)、端粒酶活阳性细胞(Telomerase-Positive Cells)(批号:20250301),均购自湖州申科生物技术股份有限公司。

### 1.3 样品制备及提取

冻存复苏的 hMSCs 作为待测样品组, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养至少 24 h。消化后, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后重悬, 计数取 1×10<sup>6</sup> 个细胞(活率约 98%)。端粒酶活阳性细胞(Telomerase-Positive Cells)作为对照组, 于 4℃下 14 000×g 离心 1 min 收集全部沉淀。待测样品组和对照组中分别加入 200 μL 细胞裂解液, 涡旋至无细胞沉淀后快速离心 3 s, 取约 160 μL 上清为提取液用于后续检测。取 10 μL 待测样品提取液置于新的 1.5 mL EP 管中, 在 85℃的金属浴中热处理 10 min, 缓慢冷却至室温后, 快速离心 3 s 将液体收集到管底作为热灭活细胞组。TRAP qPCR Reaction Buffer, TRAP qPCR Reaction Enzyme, TRAP Primer & Control MIX, TRAP qPCR Reaction Replenisher 分别按照 12.5:1:3:6.5 的比例建立 qPCR 混合体系。

### 1.4 qPCR 检测

按照分组, 在 96 孔板每个孔中依次加入 2 μL 提取液和 23 μL qPCR 混合体系液。加样完成后, 盖上配套的透明光学封板膜, 轻微振荡使反应体系充分混匀。短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪, 接着进行 qPCR 程序设置: 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。创建两组检测探针, 分别为靶标基因命名为 Target, 选择报告荧光基因为 FAM, 猝灭荧光基因为 none; 创建内参基因命名为 IC, 选择报告荧光基因为 CY5, 猝灭荧光基因为 none; 检测参比荧光为 none; 设置 3 步法反应程序: 30℃ 30 min; 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 50℃ 1 min, 68℃ 30 s(读取荧光), 35 个循环; 反应体积为 25 μL。

### 1.5 实验数据质量控制

为确保检测结果的可靠性, 只有在阳性对照、无模板对照(No Template Control, NTC)及阴性对照均符合质控要求的前提下, 待测样本的数据方可被纳入分析。具体判定标准如下: 对于阳性质控, 需内参基因(CY5) Ct 值与标曲各浓度及无模板对照组的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环。同时保证靶标基因(FAM) Ct 值有检出。对于无模板对照和阴性质控, 需内参基因(CY5) Ct 值与标曲各浓度及无模板对照组的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环, 且靶标基因(FAM)的 Ct 值 > 检测限。对于标准曲线, 需扩增效率在 83.3%~110%,  $R^2 \geq 0.990$ 。对于待测样品(在阳性质控、NTC 及阴性质控均符合实验要求的前提下), 需内参基因(CY5) Ct 值与标曲各浓度及 NTC 的平均 Ct 值相差不超过 1 个循环, 则视为待测样品

对反应体系不存在抑制。

### 1.6 结果计算及分析

端粒酶活性的定量分析包含标准曲线回归计算与每反应细胞数量换算 2 个步骤。①利用 qPCR 仪器分析软件自动生成标准曲线。以标准品浓度(TPG)的常用对数值(log<sub>10</sub>)为横坐标(x), 以对应的 Ct 为纵坐标(y)进行线性回归分析。回归方程表示为:  $y = -k \cdot x + b$  其中,  $k$  为斜率,  $b$  为截距。待测样本的端粒酶活性总量(TPG), 通过将实测 Ct 值代入上述方程的反函数进行计算:  $TPG = 10^{\frac{b - Ct}{k}}$ 。②计算每反应体系中的细胞当量。根据样本制备流程, 利用以下公式计算待测样品在 qPCR 反应体系中的细胞数量(Cells):  $Cells = \frac{\text{细胞总数}}{200 \mu\text{L}} \times \frac{1}{\text{稀释倍数}} \times 2 \mu\text{L}$  (注: 200 μL 为裂解液总体积, 2 μL 为上样模板体积; 若样本未稀释, 稀释倍数为 1)。最终, 将仪器获得的靶标基因(FAM)检测值(TPG)与每反应细胞数量进行对应, 即得到该样本在特定细胞量下的端粒酶活性(TPG/每反应细胞数量)。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证

**2.1.1 专属性检测** 将含有 1×10<sup>6</sup> 细胞数量的细胞基质热灭活, 加至高、低浓度(对应的 TPG 为 0.4、40 000 TPG)的 TSR8 样品中, 同时设置不加 TSR8 的细胞基质样品作为空白对照组, 另在 Cell Lysis Buffer 工作液中加入高、低浓度 TSR8 样品。每个样品设置 3 个平行, 观察细胞基质是否对 TSR8 检测值产生干扰, 即添加细胞基质对检测值是否有统计学显著差异。与高浓度(40 000 TPG)组相比, 40 000 TPG+热灭活细胞组和 40 000 TPG+工作液组的 FAM 荧光扩增 Ct 数值均没有显著性差异。与低浓度(0.4 TPG)组相比, 0.4 TPG+热灭活细胞组和 0.4 TPG+工作液组的 FAM 荧光扩增 Ct 数值均没有显著性差异(组间对比选择未配对  $T$  检验)(表 1)。以上结果表明, 热灭活细胞基质及工作液未对本方法产生明显干扰信号, 本检测体系能稳定区分因样品端粒酶活带来的扩增表达量的变化, 以上结果说明该方法具有较好的专属性。

**2.1.2 准确性和中间精密度** 配制 6 个浓度的 TSR8 加至细胞基质中, 浓度分别为 0.4、4、40、400、4 000、40 000 TPG, 同时设置不加 TSR8 的细胞基质样品作为空白对照组, 每个样品设置 3 个平行, 每个平行样比较 TPG 检测值与理论值, 计算回收率和 RSD。独立重复 2 次试验, 观察各浓度点回收率 95% 置信区间是否在 75%~125%, 各浓度点 RSD 95% 置信区

表 1 热灭活细胞基质和工作液干扰下高低浓度 TSR8 端粒酶活性荧光扩增 Ct 值比较

Table 1 A Comparison of Fluorescence Amplification Ct Values for High and Low Concentration TSR8 Templates under Interference from Heat-Inactivated Cell Matrix and Working Buffer

组别	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct 均值	P 值	是否具有显著性
0.4 TPG 组	29.329	29.348	29.578	29.388		-
0.4 TPG+热灭活细胞组	29.413	29.418	29.239	29.357	0.573 5	否
0.4 TPG+工作液组	28.801	29.393	29.514	29.236	0.642 7	否
40 000 TPG 组	14.542	14.509	14.355	14.469	-	-
40 000 TPG+热灭活细胞组	14.804	14.986	15.566	15.017	0.097 6	否
40 000 TPG+工作液组	14.398	14.743	14.219	14.453	0.933 1	否

注: 采用非配对 *T* 检验比较参照组与热灭活细胞组和工作液组。“-”表示参照组, 未计算统计显著性。

Note: Unpaired *t*-tests were performed to compare the heat-inactivated cell group and the working solution group against the reference group. The symbol “-” indicates the reference group; statistical significance was not calculated.

间≤25%。每个加标水平做 6 孔重复, 测定值与标定值的比即回收率均落在 90%~120% 范围内, 回收率 95% 的置信区间为 91.37%~111.0%, 符合统计学要求需结果均落在 75%~125%, 表明此方法准确度可接受(表 2)。同一人员在短时间内相同条件下连续独立试验 2 次, 测定不同组别的加标组含量并计算其 RSD。0.4、4、40、400、4 000、40 000 TPG Units 组内 RSD 值分别为 13.7%、16.7%、22.0%、17.2%、15.8%、19.7%, 均小于 25%。各组 RSD 95% 置信区间为 14.42%~20.61%, 符合统计学要求需落在 25% 以下, 结果说明此方法具备良好的中间精密度(表 2)。

**2.1.3 线性与扩增效率** 配制 6 个浓度的 TSR8, 浓度分别为 0.4、4、40、400、4 000、40 000 TPG, 每个样品设置 3 个平行, 独立重复 2 次试验, 观察标准曲线的  $R^2$  是否大于 0.98 和扩增效率是否落在 90%~110%。本试剂盒标准曲线为线性拟合, 标准曲线包含 6 个浓度, 每个浓度 3 个平行样品, 独立重复试验 2 次(表 3)。试验结果拟合后的  $R^2$  大于 0.99, 回归方程  $y = -3.228x + 29.917$ , 扩增效率为 104.1% 落在

90%~110% 内, 表明此方法拟合曲线拟合度良好。

**2.1.4 定量下限 (LLOQ 验证)** 配置 3 个浓度的 TSR8 加至细胞基质中, 浓度分别为 0.2、0.4、0.8 TPG, 同时设置不加 TSR8 的细胞基质样品作为空白对照样品, 每个样品设置 3 个平行, 检测 TPG/ 反应值。能满足准确度的最低浓度为 LLOQ。满足准确度: 回收率 95% 置信区间在 70%~130%。0.2 TPG 组的回收率 95% 置信区间为 81.1%~125.1%, 0.4 TPG 组的回收率 95% 置信区间为 95.8%~115.2%, 0.8 TPG 组的回收率 95% 置信区间为 77.5%~124.5%, 均满足统计学要求, 因此 LLOQ 为 0.2 TPG 时可以保证方法结果准确(表 4)。

**2.2 hMSCs 端粒酶活性检测**

将冻存的 hMSCs 按照方法 1.3 部分进行复苏和提取作为待测样品组, 同时设立 NTC 组、阴性对照组(热灭活细胞组)、阳性对照组(包含端粒酶阳性细胞), 同时进行标准曲线测定以定量标定实验结果。标准曲线拟合方程为  $y = -3.260x + 29.744$ ,  $R^2$  大于 0.99, 扩增效率为 102.6%, 符合方法学要求(表 5~6, 图 1)。hMSCs 内参组 Ct 值与标准曲线各浓度及 NTC 组平均 Ct 值相差不超过 1 个循环, 表明反应体系不存在抑制。hMSCs 组每反应的细胞数量为 104, 测得的 FAM(靶标基因) Ct 值为 29.417, 经标准曲线计算得到 hMSCs 每反应细胞数量的端粒酶活性为 1.432 TPG/ 万个细胞。

**3 讨论**

本研究成功验证 RQ-TRAP 方法在端粒酶活性检测中的性能, 并将其应用于 hMSCs 的评价, 揭示该方法在再生医学中的潜力。作为一种实时荧光定量 TRAP 的变体, RQ-TRAP 法通过监测端粒重复序列扩增的荧光信号, 实现端粒酶活性的精确量化, 克服传统 TRAP 方法的半定量局限性和假阳性问题。从反应动力学角度来看, 传统凝胶法(Gel-Based Telomeric Repeat Amplification Protocol, Gel-TRAP) 属于终点法检测。由于其检测结果反映的是 PCR 反

表 2 不同浓度 TSR8 加标细胞基质样品的回收率及相对标准偏差分析  
Table 2 Analysis of Recovery Rates and Relative Standard Deviations (RSD) for Cell Samples Spiked with Varying Concentrations of TSR8

浓度/TPG	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct4 值	Ct5 值	Ct6 值	测定浓度均值	回收率均值/%	RSD/%
0.4	31.119	31.304	31.304	31.153	30.940	31.329	0.404	100.0	13.7
4	28.279	27.820	28.373	27.852	27.844	27.924	3.915	98.9	16.7
40	25.135	24.458	24.915	24.427	24.273	24.604	45.041	112.6	22.0
400	21.636	21.655	21.516	21.112	21.712	21.415	414.286	104.7	17.2
4 000	18.482	18.514	18.110	18.607	18.688	18.758	3 965.504	90.0	15.8
40 000	14.887	15.386	14.665	14.678	14.678	15.183	49 508.344	119.1	19.7

表 3 梯度稀释 TSR8 标准品的标准曲线回归参数及扩增效率分析

Table 3 Analysis of Standard Curve Regression Parameters and Amplification Efficiency Based on Serially Diluted TSR8 Standards

标曲浓度 / TPG	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct4 值	Ct5 值	Ct6 值	Ct 均值
0.4	31.119	31.304	31.304	31.153	30.940	31.329	31.191
4	28.279	27.820	28.373	27.852	27.844	27.924	28.015
40	25.135	24.458	24.915	24.427	24.273	24.604	24.635
400	21.636	21.655	21.516	21.112	21.712	21.415	21.508
4 000	18.482	18.514	18.110	18.607	18.688	18.758	18.527
40 000	14.887	15.386	14.665	14.678	14.678	15.183	14.913

表 4 低浓度 TSR8 加标样品的回收率及 95% 置信区间分析

浓度 / TPG	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	回收率 1%	回收率 2%	回收率 3%	回收率 1% (95% 置信区间)
0.2	32.211	32.172	31.991	1.132	0.967	0.994	81.1~125.1
0.4	31.087	31.099	31.183	1.082	1.073	1.010	95.8~115.2
0.8	30.089	30.217	30.351	1.106	1.009	0.916	77.5~124.5

表 5 hMSCs 端粒酶活性检测实验的标准曲线回归参数及扩增效率分析

Table 5 Analysis of Standard Curve Regression Parameters and Amplification Efficiency for Quantification of Telomerase Activity in hMSCs.

浓度 / TPG	内参基因 (CY5)				靶标基因 (FAM)			
	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct 均值	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct 均值
0.4	17.889	17.777	17.788	17.656	31.304	31.153	31.329	31.326
4	17.798	17.577	17.419	17.598	27.852	27.852	26.924	27.532
40	17.790	17.474	17.552	17.605	24.458	24.458	24.604	24.496
400	18.039	17.488	16.745	17.424	21.655	21.655	21.015	21.261
4000	17.839	17.470	16.710	17.329	17.514	17.514	17.758	17.626
40 000	17.289	16.739	17.385	17.138	15.386	15.386	15.183	15.082

表 6 hMSCs 样本端粒酶活性的定量检测结果

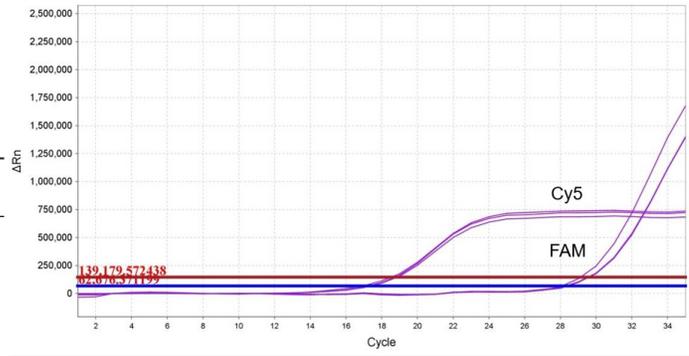
Table 6 Quantitative Detection Results of Telomerase Activity in hMSC Samples.

实验 分组	内参基因 (CY5)				靶标基因 (FAM)			
	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct 均值	Ct1 值	Ct2 值	Ct3 值	Ct 均值
NTC 组	17.526	17.666	17.462	17.551	-	-	-	-
阴性对 照组	17.143	16.962	16.791	16.965	-	-	-	-
阳性对 照组	17.394	16.304	17.281	16.997	22.973	23.252	22.857	23.027
待测样 品组	17.307	16.781	17.148	17.095	29.597	29.109	29.544	29.417

注：“-”表示未检出荧光扩增信号 (Undetermined)。

Note: The symbol “-” indicates that no fluorescence amplification signal was detected (Undetermined).

应结束时的产物累积量, 此时反应已进入平台期, 受限于试剂耗竭及酶活性下降, 产物量与初始模板量之间不再保持线性关系, 从而限制其绝对定量能力。相比之下, RQ-TRAP 通过荧光探针在 PCR 指数扩增期进行实时监测, 此阶段扩增效率相对恒定, Ct 值与初始端粒酶活性在一定动态范围内呈良好的对



注: 横坐标 (Cycle) 表示 PCR 循环数; 纵坐标 ( $\Delta Rn$ ) 表示经基线校正后的标准化荧光报告信号强度。图中红色直线为荧光阈值线 (Threshold Line); 蓝色曲线代表无模板对照 (NTC) 和阴性对照组的扩增轨迹; 紫色曲线代表 hMSCs 组的扩增轨迹, 其中上方曲线为内参基因 (Cy5), 下方曲线为靶标基因 (FAM)。

Note: The X-axis (Cycle) represents the PCR cycle number, and the Y-axis ( $\Delta Rn$ ) represents the baseline-corrected normalized reporter signal intensity. The horizontal red line indicates the fluorescence threshold line. The blue curves depict the amplification trajectories of the No Template Control (NTC) and Negative Control groups. The purple curves represent the hMSCs group, where the upper curve corresponds to the internal control gene (Cy5) and the lower curve corresponds to the target gene (FAM).

图 1 hMSCs 端粒酶活性 RQ-TRAP 法检测结果  
Figure 1 Detection of Telomerase Activity in hMSCs by RQ-TRAP Assay

数线性负相关, 有效避免终点法所固有的平台期效应<sup>[15]</sup>。此外, 与主要反映 hTERT 蛋白水平的 ELISA 方法不同, RQ-TRAP 直接检测酶的催化活性, 更能真实反映细胞的功能状态。对于 hMSCs 这类端粒酶活性处于较低或临界水平的样本, RQ-TRAP 的闭管检测模式不仅降低气溶胶污染风险, 其高灵敏度亦确保微量样本分析的可靠性。

方法学验证结果显示, 该方法专属性强, 准确性和精密度高, 线性良好, LLOQ 为 0.2 TPG Units, 证实其适用于 hMSCs 等低表达样本的检测。这些指标与文献一致, 例如 WV 等<sup>[16]</sup>报道的 CRISPR 辅助端粒酶激活基因表达系统中, RQ-TRAP 用于量化肿瘤细胞端粒酶活性, 显示高灵敏度和特异性; 同样, GONZÁLEZ-GUALDA 等<sup>[17]</sup>在人外周血单个核细胞检测中的 Ct 值分布与标准曲线拟合情况也与本研究类似。该方法无需放射性标记, 兼容微量样本且变异系数低, 适用于高通量检测。

在 hMSCs 的实际应用中, 研究检测得端粒酶活性为 1.432 TPG/万个细胞 (Ct=29.417)。这一结果表明 hMSCs 的端粒酶表达虽然存在, 但水平较低, 这与文献报道相符。hMSCs 维持微弱或受限的端粒酶活性, 旨在维持有限增殖的同时避免肿瘤化风险。例如, ZHANG 等<sup>[18]</sup>指出 hMSCs 端粒酶参与抗氧化、

抗凋亡和免疫调节等非经典功能,其活性不足以完全维持端粒长度,从而导致体外扩增时的遗传不稳定和衰老;KARAGYAUUR等<sup>[19]</sup>报道hMSCs虽能通过端粒酶进行一定程度的端粒维持,但活性限制仍带来扩增挑战。研究的数据支持将RQ-TRAP作为评估hMSCs衰老和肿瘤风险的核心工具。

尽管本研究以hMSCs为模型,但RQ-TRAP方法具有较好的普适性。脊椎动物端粒序列的高度进化保守性(TTAGGG重复序列),保证本研究采用的底物引物和反向引物能够特异性扩增多种人类细胞类型(如多功能诱导干细胞、造血干细胞及肿瘤细胞系)及其他灵长类动物样本的端粒酶反应产物<sup>[20]</sup>。对于不同来源的细胞,仅需根据其细胞体积及胞质特性对裂解条件进行适当优化,以确保端粒酶的充分释放,即可在相同反应体系下参考本方法建立的标准曲线,对端粒酶活性进行定量分析。

LI等<sup>[21]</sup>强调,端粒酶活性下降是干细胞衰老和组织衰退的关键特征。而通过外源性hTERT过表达虽可逆转衰老,却可能引入成瘤风险。RQ-TRAP法可作为监测工程化hMSCs安全性的重要手段。在本研究中,样本未表现出明显的反应抑制(符合质控标准),证明方法对该类样本的适用性。然而,该方法也存在其局限性,如端粒酶活性受培养条件影响,如氧化应激可激活非端粒功能(MATVEEVA等<sup>[22]</sup>),建议未来整合多重探针以进一步增强特异性,并在临床转化前扩大样本量进行验证。

综上所述,本研究确立RQ-TRAP在hMSCs检测中的可靠性,为先进治疗药品的安全应用与评价提供参考。

## 参考文献

[1] CHENG X, FU QY, ZHENG YL, et al. Telomerase-Active Urine-Derived Stem Cells: Regenerative Solutions for Aging[J]. Ageing Res Rev, 2026, 113: 102939.

[2] APETROAEI MM, FRAGKIADAKI P, VELESCU BŞ, et al. Pharmacotherapeutic Considerations on Telomere Biology: the Positive Effect of Pharmacologically Active Substances on Telomere Length[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7694.

[3] AFSHARIF N, AL-GAZALLY ME, RASULOVA I, et al. Sensitive Bioanalytical Methods for Telomerase Activity Detection: a Cancer Biomarker[J]. Anal Methods, 2022, 14(42): 4174–4184.

[4] CASADIO V, BRAVACCINI S. Telomerase Activity Analysis in Urine Sediment for Bladder Cancer[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2292: 133–141.

[5] HE Y, CUI Y, WANG L, et al. Extracellular Vesicles for Delivery of Functional Telomerase[J]. Cell Commun Signal, 2025, 23(1): 509.

[6] KHALIFEZADEH M, MASOUMI S, NAJAFI K, et al. Telomerase Biosensors: a Promising Approach in Cancer Diagnostics[J]. Clin

Chim Acta, 2026, 579: 120668.

- [7] CARLUND O, NORBERG A, OSTERMAN P, et al. Telomerase Activity in T-Cells as a Functional Test for Pathogenicity Assessment of Novel Genetic Variants in Telomere Biology Disorders[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 29048.
- [8] NAKAMURA K. Key Mediators of the Efficacy of Mesenchymal Stem Cells on *in vivo* Disease Models[J]. Cell Transplant, 2025, 34: 9636897251348566.
- [9] YAMAGUCHI N, HORIO E, SONODA J, et al. Immortalization of Mesenchymal Stem Cells for Application in Regenerative Medicine and Their Potential Risks of Tumorigenesis[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(24): 13562.
- [10] HU L, WANG J, ZHOU X, et al. Exosomes Derived from Human Mesenchymal Stem Cells as Nanocarriers for Drug Delivery[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 107.
- [11] AFKHAMHI H, MAHMOUDVAND G, FAKOURI A, et al. New Insights in Application of Mesenchymal Stem Cells Therapy in Tumor Microenvironment: Pros and Cons[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1255697.
- [12] KARAGYAUUR M, PRIMAK A, BASALOVA N, et al. Safety and Regenerative Properties of Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Secretome[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(19): 9322.
- [13] CHIN SP, SAFFERY NS, THEN KY, et al. Preclinical Assessments of Safety and Tumorigenicity of Very High Doses of Allogeneic Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells[J]. In vitro Cell Dev Biol Anim, 2024, 60(3): 307–319.
- [14] LEONOV GE, GRINCHEVSKAYA LR, MAKHNACH OV, et al. Safety Assessment of Stem Cell-Based Therapies: Current Standards and Advancing Frameworks[J]. Cells, 2025, 14(21): 1660.
- [15] FÄHNRIK S, WEDEMANN A, STEEBPASS L, et al. Optimized for Routine: Highly Sensitive Fluorescent Telomeric Repeat Amplification Protocol (f-TRAP)[J]. Biotechniques, 2024, 76(10): 517–522.
- [16] WU X, WU J, DAI J, et al. Aggregation-Induced Emission Luminogens Reveal Cell Cycle-Dependent Telomerase Activity in Cancer Cells[J]. National Science Review, 2021, 8(6): nwa306.
- [17] GONZÁLEZ-GUALDA E, BAKER AG, FRUK L, et al. A Guide to Assessing Cellular Senescence *in vitro* and *in vivo*[J]. FEBS J, 2021, 288(1): 56–80.
- [18] ZHANG S, XIONG W, XU S, et al. Recent Advances in DNA Systems for In Situ Telomerase Activity Detection and Imaging[J]. Chemosensors, 2025, 13(1): 17.
- [19] KARAGYAUUR M, PRIMAK A, BASALOVA N, et al. Safety and Regenerative Properties of Immortalized Human Mesenchymal Stromal Cell Secretome[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(19): 9322.
- [20] SCHELLNEGGER M, HOFMANN E, CARNIELETTO M, et al. Unlocking Longevity: the Role of Telomeres and Its Targeting Interventions[J]. Front Aging, 2024, 5: 1339317.
- [21] LI Y, ZHANG F, QINZ, et al. Development of 3D Cell-Based Fluorescent Reporter Assay for Screening of Drugs Downregulating Telomerase Reverse Transcriptase[J]. Bioengineering, 2025, 12(4): 335.
- [22] MATVEEVA D, KASHIRINA D, EZDAKOVA M, et al. Senescence-Associated Alterations in Matrisome of Mesenchymal Stem Cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(10): 5332.

(收稿日期: 2025-12-19 编辑: 孔繁瑶)