

国产间充质干细胞培养基取代进口的可行性探究

陈辉[#], 张芬[#], 王嘉楠, 王清芳, 储玉龙^{*}

(深圳市北科生物科技有限公司, 广东深圳 518000)

摘要: 本研究系统比较了国产与进口培养基在间充质干细胞 (MSCs) 培养中的性能差异。采用 3 种不同的培养体系对 MSCs 进行培养, 从细胞形态、表面标志物、分化潜能、免疫调节能力、细胞核型分析、细胞衰老率及软琼脂克隆形成等关键指标, 全面评估了不同培养体系中 MSCs 的安全性、有效性及细胞产量。结果显示, 3 种培养体系中的 MSCs 均呈现典型的梭形形态, 细胞表面标志物符合国际干细胞标准, 具备成骨、成脂及成软骨的分化潜能; 细胞核型正常, 软琼脂克隆试验证实其无致瘤风险。上述结果显示, 国产与进口培养基无明显差异。国产培养基在某些方面展现出一定的优势: 细胞增殖能力强; 传代稳定性高; 在免疫调节功能上, 对 T 淋巴细胞及 TNF- α 的抑制作用更强; 细胞衰老率低。此外, 以国产培养基作为冻存液成分时, 细胞复苏后活性恢复更快。该研究为推进培养基国产化进程提供了科学依据, 有助于提升我国在干细胞研究与应用领域的自主创新能力和国际竞争力。

关键词: 间充质干细胞; 免疫调节; 安全性; 增殖能力; 培养基; 可行性研究

中图分类号: Q813.1[†]

文献标志码: A

文章编号: 1001-8255(2025)11-1404-08

引用: 陈辉, 张芬, 王嘉楠, 等. 国产间充质干细胞培养基取代进口的可行性探究 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, 56(11): 1404-1411. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2025.11.006

Feasibility Study on the Replacement of Imported Mesenchymal Stem Cell Culture Media by Domestic Ones

CHEN Hui[#], ZHANG Fen[#], WANG Jianan, WANG Qingfang, CHU Wanglong^{*}

(Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518000)

ABSTRACT: The study systematically compared the performance differences between domestic and imported culture media in the cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs). Three distinct culture systems were employed to culture MSCs, and key indicators including cell morphology, cell surface markers, differentiation potential, immunomodulatory capacity, karyotype analysis, cellular senescence, and soft agar colony formation were comprehensively evaluated to assess the safety, efficacy, and cell yield of MSCs in different culture systems. The results demonstrated that MSCs cultured in all three systems exhibited the typical spindle-shaped morphology, with cell surface markers conforming to international stem cell standards, and possessed osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation potential. The karyotype was normal, and soft agar colony formation assays confirmed the absence of tumorigenic risk. The results indicated that there was no significant difference between domestic and imported culture media. However, the domestic culture medium demonstrated certain advantages in some aspects: it had stronger cell proliferation ability and higher passage stability. In terms of immunomodulatory function, the domestic medium exhibited stronger inhibitory effects on T lymphocyte suppression and TNF- α . Cellular senescence assays showed a lower senescence rate in the domestic culture system. Additionally, when the domestic medium was used as a cryopreservation solution component, cells demonstrated faster recovery of viability post-thawing. This study provides scientific evidence to advance the domestic production of culture media in China, thereby enhancing the country's independent innovation capabilities and international competitiveness in the field of stem cell research and application.

Key Words: mesenchymal stem cell; immunomodulation; safety; proliferation capacity; culture media; feasibility study

生物试剂是生命科学领域研究的重要组成部分,同时也是我国生命科学领域“卡脖子”领域。随着我国对科研创新重视程度的不断加深,有关部门相继出台了一系列产业政策(如《“十四五”生物经济发展规划》),注重研发具有自主知识产权的通用试剂,增强相关产业的核心竞争力。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能、免疫调节能力,在再生医学领域具有广阔的应用前景^[1-2],是生命科学研究的热点。培养基在MSCs培养中的作用至关重要,进口培养基一度占据重要地位,但近年来国产培养基的优势渐显。

当前,不同厂家培养基对MSCs质量影响的研究备受关注,但大多集中于比较特定方面的差异,全面比较国产与进口培养基的研究较少^[3-4]。本研究深入探讨了不同厂家(特别是国产与进口)培养基对MSCs质量的影响,通过分析细胞形态、增殖活性、表面标志物表达、多向分化潜能和免疫调节功能等指标,揭示二者在MSCs培养效果上的差异^[5]。期望本研究可为我国MSCs的研究和临床应用提供选择依据,在降低成本、提高资源利用效率的同时进一步推动国内生物技术产业发展,增强我国在干细胞领域的自主创新和核心竞争力。

1 仪器与试剂

240i型二氧化碳培养箱购(美国 Thermo Fisher 公司); Vi-CELL BLU 型全自动细胞计数及存活率分析仪(美国 Beckman-Coulter 公司); CKX53SF 型荧光倒置显微镜、IX71 型显微镜均购自美国 Olympus 公司; FACSLytic™ 型流式细胞仪(美国 BD 公司); AC2-4S1 型生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司); TP1020 型组织脱水包埋机、RM2235 型组织切片机均购自德国莱卡公司; HPJ-A 型烘片机(金华市华海科教仪器厂); Axio Imager A2 型核型纤维镜、Ikaros 型染色体核型分析系统购自德国蔡司公司。

MSCs 无血清培养基(中国 A 公司,批号 M1240818; 美国 B 公司,批号 0001045581); 人 MSCs 培养基(以色列

C 公司,批号 234600612); 杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 台盼蓝(上海睿钰生物科技有限公司); 4%多聚甲醛固定液、PBS、Giemsa 染色工作液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 7-氨基放线菌素 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)、流式荧光标记抗体(CD3-FITC、CD4-PE-CY7、CD8-APC-CY、IFN- γ -PerCP、IL-4-PE、IL-17A-APC、CD25-APC 和 CD127-PE)均购自美国 BD 公司; 成骨、成脂和成软骨诱导培养基、阿利新蓝均购自中国赛业生物科技有限公司; 茜素红(国药集团化学试剂有限公司); 秋水仙碱、油红 O(上海阿拉丁生化科技有限公司); 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE, 美国 Invitrogen 公司); 10%胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司); 1640 培养基(美国 Thermo Fisher 公司); 植物血凝素-P(phytohemagglutinin P, PHA-P, 德国 Sigma 公司); 布雷非德菌素 A(Brefeldin A, BFA, 杭州联科生物技术股份有限公司); 人 TNF- α ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 甲醇、冰乙酸均购自上海麦克林生化科技有限公司; 0.9%氯化钠溶液(四川科伦药业股份有限公司); 0.1%结晶 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司); 2%琼脂糖(日本 Takara 公司); DMSO(德国 WAK 公司); T75 细胞培养瓶(丹麦 Nunc 公司); 12 孔板(美国 Corning 公司)。

3 份脐带样本均来自 20 ~ 35 岁的健康供者(产妇),且样本的获取经过深圳市北科生物科技有限公司伦理委员会批准(伦理号 BK-SL-20240624-01),并经过供者知情同意。外周血样本来自 20 ~ 30 岁的健康供者,且样本的获取经过深圳市北科生物科技有限公司伦理委员会批准(伦理号 BK-SL-20240624-01),并经过供者知情同意。采集后的样本在 12 h 内运输至实验室并制备。

人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 人脐带 MSCs 的分离培养

取 3 份脐带样本,每 1 份分为 3 组,分别来源于 A、B、C 公司的培养基进行培养,标记为 A、B、C 组。脐带样本首先经 DPBS 冲洗,去除动脉、静脉和羊膜,将华通胶剪成体积 1 ~ 4 mm³ 的小块,

[†] 对文章贡献等同。

收稿日期: 2025-08-23

作者简介: 陈 辉, 工程师, 从事细胞研究与开发。

张 芬, 工程师, 从事细胞研究与开发。

通信作者: 储王龙, 高级工程师, 从事细胞研究与开发。

接种于装量为 8 mL 培养基的 T75 细胞培养瓶中，置 37 °C、5% CO₂ 条件下培养，每隔 3 d 换液，待融合度达 70%~80% 时收集 P0 代细胞，按每 1 cm² 含 5 000~6 000 个细胞的密度接种传代。收集部分 P2 代细胞用于冻存、复苏培养分析，其余 P2 代细胞传至 P10 代，分别在 P5 代和 P10 代收集细胞并检测其细胞表面标志物、分化潜能、免疫调节能力、细胞核型、细胞衰老率和软琼脂克隆形成。

2.2 统计分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析和绘制图表。数据以均值 ± 标准差表示。P 值小于 0.05 被视为具有统计学意义。

2.3 细胞状态评价

2.3.1 细胞形态、数量及存活率

采用光学显微镜观察细胞形态。细胞数量和存活率采用自动细胞计数仪以台盼蓝排除法测定。在 0.2% 台盼蓝染色的基础上，结合先进的液体处理和动态细胞成像技术，实现标准化的全自动测量。

用 3 种培养基培养的 P5 和 P10 代 MSCs 在光学显微镜下均呈典型梭形形态，大小均一，长几十至几百微米、宽度适中（图 1）。照片显示，细胞边缘光滑，无毛刺或突起，完整性好。培养时观察到细胞紧密贴壁生长，呈集落时以涡旋状分布，有规律

和对称性。所得细胞胞质丰富，细胞核大，呈圆形或椭圆形且居中央，核仁清晰，染色质均匀分布。

2.3.2 细胞增殖分析

按如下公式计算群体倍增时间 (population doubling time, PDT)^[6]，进行细胞增殖分析。倍增时间越短表明细胞增殖能力越强。

$$PDT = T \times \log 2 / (\log N - \log X_0)$$

式中：T 指各个传代的初始培养瓶培养和收获之间的时间；N 是收获细胞的总数；X₀ 是初始培养瓶培养的细胞总数。

结果（图 2）显示，3 组样本的 PDT 均随代次改变，其中 A 组细胞的 PDT 的变化幅度较小，表明 A 组细胞在连续传代时增殖能力非常稳定，细胞活性高，且高代次时的稳定性更为突出。B 组与 C 组细胞 PDT 的变化幅度大于 A 组，彰显出培养基 A 在维系 MSCs 连续传代稳定性方面的优越性^[7]。

2.3.3 细胞表面标志物检测

取不少于 6×10⁶ 个的 P5 和 P10 代细胞，使用 1×PBS 洗涤后，按说明书分组加入流式荧光标记抗体进行标记，2~8 °C 避光孵育 30 min 后，洗涤 2 次，采用流式细胞仪分析，检测细胞表面标志物 CD73、CD90、CD105、CD29、CD45、CD34、CD79a、CD14 和人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen,

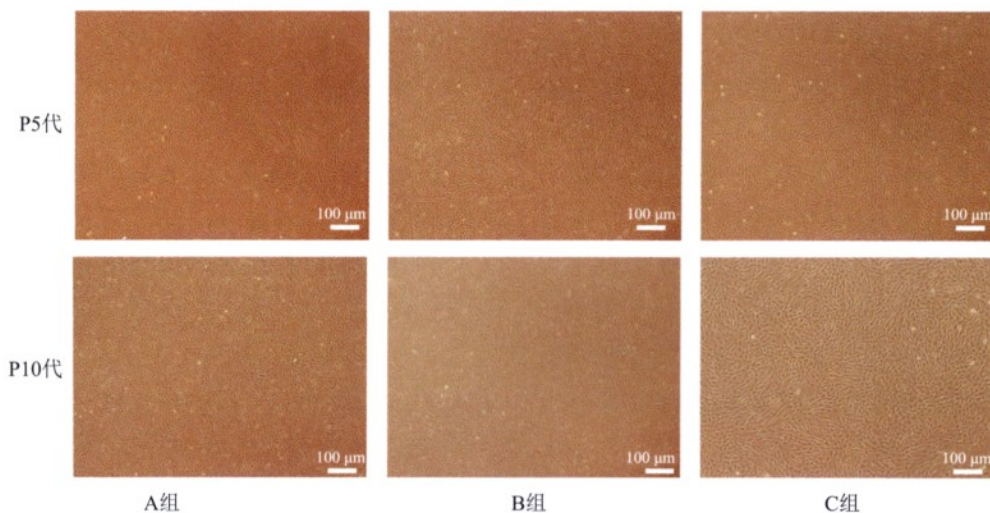


图 1 P5 代和 P10 代脐带 MSCs 在不同培养基中培养 4 d 时的形态学观察

Fig.1 Morphological Observation of P5 and P10 Umbilical Cord MSCs Cultured in Different Media for 4 d

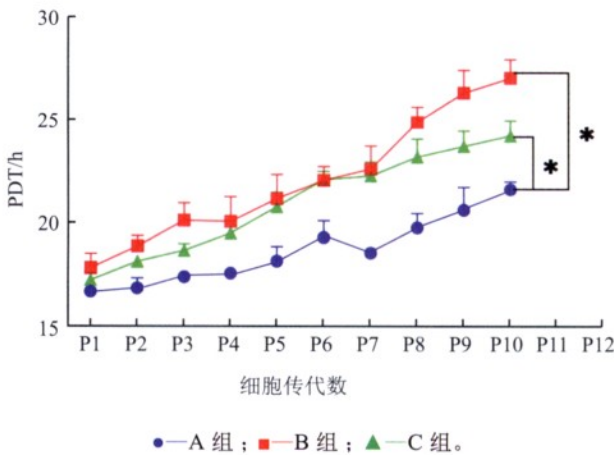
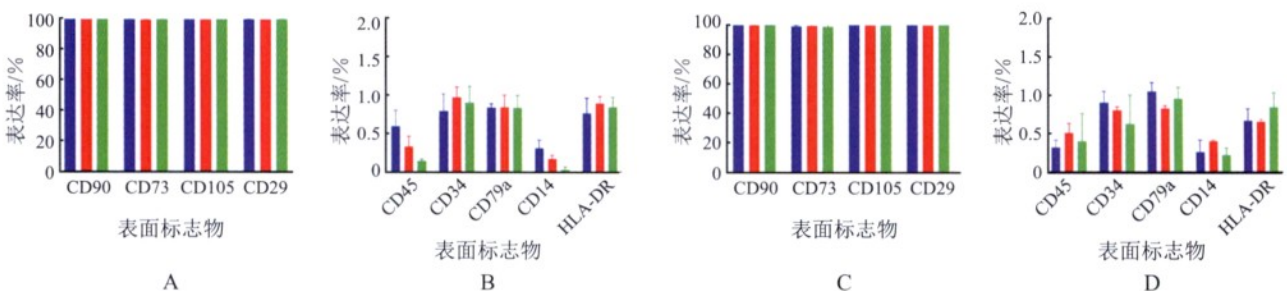


图2 人脐带 MSCs 在 3 种培养基中的 PDT ($n=3$, *表示与 A 组相比 $P < 0.05$)

Fig.2 PDT of Human Umbilical Cord MSCs Cultured in Three Types of Culture Media ($n=3$; *Represents compared with group A, $P < 0.05$)

HLA)-DR 的表达率, 比较各培养组间细胞表面标志物表达的差异, 分析各培养体系对细胞表面标志物表达的影响。

结果 (图 3) 显示, 3 种培养体系下的 P5 和 P10 细胞表面标志物, CD90、CD73、CD105、CD29 的表达率均大于 95%, CD45、CD34、CD79a、CD14、人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA-DR 表达率均小于 2%, 结果均符合国际干细胞协会对人源干细胞表面标志物^[8] 鉴定的要求。



A—P5 代细胞表面标志物 CD90、CD73、CD105、CD29 的表达率; B—P5 代细胞表面标志物 CD45、CD34、CD79A、CD14、HLA-DR 的表达率; C—P10 代细胞表面标志物 CD90、CD73、CD105、CD29 的表达率; D—P5 代细胞表面标志物 CD45、CD34、CD79A、CD14、HLA-DR 的表达率。

■—A 组培养基; ■—B 组培养基; ■—C 组培养基。

图3 不同培养基中脐带 MSCS 的细胞表面标志物表达率 ($n=3$)

Fig.3 Expression Levels of Cell Surface Markers of Umbilical Cord MSCs Cultured in Different Media ($n=3$)

2.3.4 分化潜能检测

将 P5 和 P10 代细胞按照每 1 mL 含 3×10^5 个细胞的密度接种于 12 孔板, 在 37°C 、5% CO_2 条件下, 使用成骨、成脂和成软骨诱导培养基培养。置显微镜下观察, 发现明显分化现象后, 用 4% 多聚甲醛固定, 再分别用 1% 茜素红溶液、油红 O 和阿利新蓝染色, 然后镜检、拍照。若成骨诱导成功, 经茜素红染色, 镜下可见红色的钙盐沉积; 若成脂诱导成功, 经油红 O 染色, 可见橘红色的脂滴; 若成软骨诱导成功, 经阿利新蓝染色, 可见蓝色的软骨细胞。

结果 (图 4) 显示, 3 种培养基培养的 P5 和 P10 代 MSCs 在体外均具有成骨、成脂、成软骨的分化能力。

2.3.5 免疫调节能力检测

外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的分离及 CFSE 标记: 通过 Ficoll 密度梯度离心法分离健康成人 PBMC 30 mL, 加入 CFSE 染液, 37°C 避光孵育 10 min 后, 加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 min, 以中和游离染料, 再用 1640 培养基洗涤 2 次, 重悬后计数。下述免疫调节能力检测的样本均在 37°C 、5% CO_2 条件下使用 1640 培养基培养。

对淋巴细胞的增殖抑制: 将 P5 和 P10 代 MSCs 以每孔 1.2×10^5 个细胞的密度接种至 12 孔板, 分别用 3 种培养基培养 4 ~ 6 h, 弃去上清, 每孔剩余

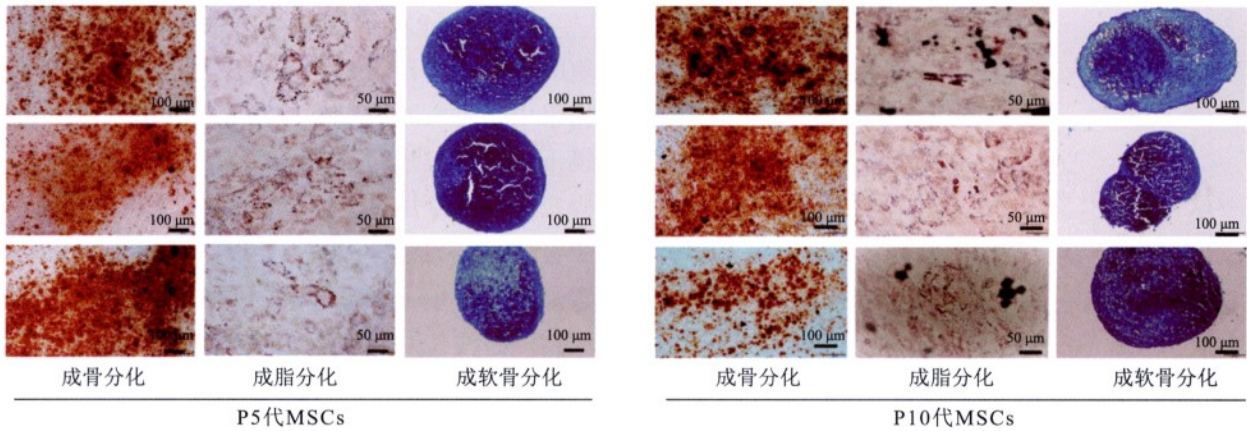


图4 不同培养基中脐带 MSCs 的分化潜能

Fig.4 Differentiation Potential of Umbilical Cord MSCs Cultured in Different Media

物中加入 6.0×10^5 个 CFSE 标记的 PBMC 和终质量浓度为 $8 \mu\text{g/mL}$ 的 PHA-P 共培养。以 CFSE 标记的 PBMC 单独培养作为阴性对照组，PHA-P 刺激 CFSE 标记的 PBMC 培养作为阳性对照组。每组设置 3 个平行。各组细胞培养 96 h 后，收集 PBMC 细胞悬液，每管加入 7-AAD $5 \mu\text{L}$ ，采用流式细胞仪分析 MSCs 对淋巴细胞的增殖抑制率。

对淋巴细胞亚群 (Th1/Th2/Th17) 调控：取 P5 和 P10 代 MSCs，以每孔 1.2×10^5 个细胞的密度接种至 12 孔板，培养 4 ~ 6 h，弃去上清，每孔剩余物中加入 6.0×10^5 个 PBMC 共培养 36 h 后，加入终质量浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的离子霉素 (Ionomycin)、 50 ng/mL 的 PHA-P、 10 ng/mL 的 BFA，刺激 6 ~ 8 h。以无 MSCs 作为阳性对照，PBMC 单独培养为阴性对照。收集各组 PBMC 细胞悬液，每管加入相应流式荧光标记抗体 (CD3-FITC $10 \mu\text{L}$ ，CD4-PE-CY7 $2.5 \mu\text{L}$ ，CD8-APC-CY7 $2.5 \mu\text{L}$ ，IFN- γ -PerC $2.5 \mu\text{L}$ ，IL-4-PE $2.5 \mu\text{L}$ ，IL-17A-APC $2.5 \mu\text{L}$) 孵育 30 min，采用流式细胞仪分析 MSCs 对 Th1/Th2/Th17 细胞的抑制率。

对调节性 T 细胞 (T_{reg} 细胞) 调控：取 P5 和 P10 代 MSCs，以每孔 1.2×10^5 个细胞的密度接种至 12 孔板，培养 4 ~ 6 h，每孔加入 6.0×10^5 个 PBMC 共培养 96 h。以 PBMC 单独培养为阴性对照。收集各组 PBMC 细胞悬液，每管加入相应流式荧光标记抗体 (CD3-FITC $10 \mu\text{L}$ ，CD4-PE-CY7 $2.5 \mu\text{L}$ ，

CD25-APC $10 \mu\text{L}$ ，CD127-PE $2.5 \mu\text{L}$) 孵育 30 min，采用流式细胞仪测定 MSCs 对 T_{reg} 细胞的增殖效果。

对淋巴细胞中 TNF- α 分泌的抑制：取 P5 和 P10 代 MSCs，以每孔 1.2×10^5 个细胞的密度接种至 12 孔板，培养 4 ~ 6 h，每孔加入 6.0×10^5 个 PBMC 和终质量浓度为 $8 \mu\text{g/mL}$ 的 PHA-P 作为共培养组。以 PBMC 单独培养作为阴性对照组，PHA-P 刺激的 PBMC 培养作为阳性对照组。每组设置 3 个平行。各组细胞培养 96 h 后，收集上清，按人 TNF- α ELISA 试剂盒说明书分析 TNF- α 的水平。

结果 (表 1) 显示，3 种培养基培养的 P5 和 P10 代 MSCs 均表现出不同程度的免疫调节能力，能有效地抑制淋巴细胞及亚群细胞 Th1、Th2、Th17 的增殖，TNF- α 的分泌，并促进 T_{reg} 细胞增殖。A 组培养基体系中，不同代次 MSCs 对 T 淋巴细胞的抑制率均较高，意味着采用 A 组培养基培养的人脐带 MSCs 在免疫系统疾病及器官移植方面的应用前景良好。此外，A 组培养的 MSCs 对 TNF- α 的抑制效果也较佳，说明其可有效减少炎症反应，在临床应用中有望取得更佳效果。

2.3.6 核型分析检测

使用 Giemsa 染色技术进行细胞核型分析。首先，取 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个 P5 代 MSCs 于 T75 培养瓶中培养 2 ~ 3 d，直至达到对数生长期，加入 0.3 g/mL 秋水仙碱溶液 $150 \mu\text{L}$ ，在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 2 ~ 3 h。然后，细胞经 PBS 洗涤并用胰蛋白酶消化，悬浮在温热的

表 1 免疫调节能力检测结果 (n=3)
Tab.1 Detection Results of Immunomodulatory Capacity (n=3)

代次	项目	A 组 /%	B 组 /%	C 组 /%	SD 值 /%	P 值	
P5	MSCs 对淋巴细胞增殖的抑制率	30	39	55	12.66	<0.05	
	MSCs 对淋巴细胞亚群调控	Th1 抑制率	19	8	45	18.68	<0.05
		Th2 抑制率	46	32	100	35.77	<0.05
		Th17 抑制率	46	48	48	1.34	<0.05
		T _{reg} 细胞增殖率	18	21	18	1.82	<0.05
	MSCs 对淋巴细胞分泌 TNF- α 抑制率	101	98	73	15.44	<0.05	
P10	MSCs 对淋巴细胞增殖的抑制率	65	33	53	16.18	<0.05	
	MSCs 对淋巴细胞亚群调控	Th1 抑制率	18	7	5	6.82	<0.05
		Th2 抑制率	89	29	44	31.49	<0.05
		Th17 抑制率	41	45	43	1.96	<0.05
		T _{reg} 细胞增殖率	17	19	3	8.64	<0.05
	MSCs 对淋巴细胞分泌 TNF- α 的抑制率	93	88	70	12.09	<0.05	

低渗溶液 (0.075 mol/L 氯化钾溶液) 中, 在 37 °C 保温 30 ~ 40 min, 再用固定液 (甲醇和冰乙酸体积比为 3 : 1 的混合物) 洗涤 3 次。随后, 将细胞重新悬浮在新鲜的固定液中, 并滴在预冷的载玻片上。将载玻片在 70 °C 干燥至少 3 h 后, 将载玻片浸入 0.01% 胰蛋白酶溶液中 0.5 ~ 2 min, 用 0.9% 氯化钠溶液冲洗 2 次, 然后用 Giemsa 染色工作液染色。采用显微镜观察并拍照, 并用核型分析软件 (V5.8.12) 处理分析染色体图像。

结果显示, 3 种培养基所培养的细胞均呈现出清晰的核型特征。经仔细观察与精确计数, 均检测出 46 条染色体, 且未见染色体数目及结构存在任何异常。从核型稳定性角度来看, 3 种培养基培养的细胞无显著差异, 可为人脐带 MSCs 的进一步研究和应用提供可靠的遗传学依据。

2.3.7 细胞衰老率检测

按照细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书, 对 P5 和 P10 代 MSCs 进行细胞衰老率测定^[9]。将细胞以每 1 cm² 含 2 000 个细胞的密度接种于 6 孔板中。当融合度达到 70% ~ 80% 时, 弃去上清, 用 1×PBS 洗涤细胞, 每孔剩余物中加入 β -半乳糖苷酶染色固定液 1 mL, 室温固定 15 min 后, 用 1×PBS 洗涤 3 次。每孔剩余物中加入 X-gal 染色工作液 0.25 mL, 于 37 °C 孵育过夜。冲洗掉染色溶液后, 使用倒置显微镜观察。视野内染上深蓝色的为衰老细胞, 每孔用五点取样法拍 5 个视野的照片, 然后分别对衰老细胞和总细

胞进行计数, 计算二者比例, 即得细胞衰老率。

结果 (图 5) 显示, 在 P5 代细胞中, A、B、C 组 MSCs 的细胞衰老率分别为 (0.58±0.02) %、(0.60±0.02) % 和 (0.59±0.03) %, 无显著性差异 (P>0.05); 但在 P10 代细胞中, A、B、C 组 MSCs 的细胞衰老率分别为 (2.02±0.24) %、(3.31±0.11) % 和 (2.44±0.35) %, 存在显著性差异 (P<0.05), 其中 A 组 MSCs 的细胞衰老率较低。

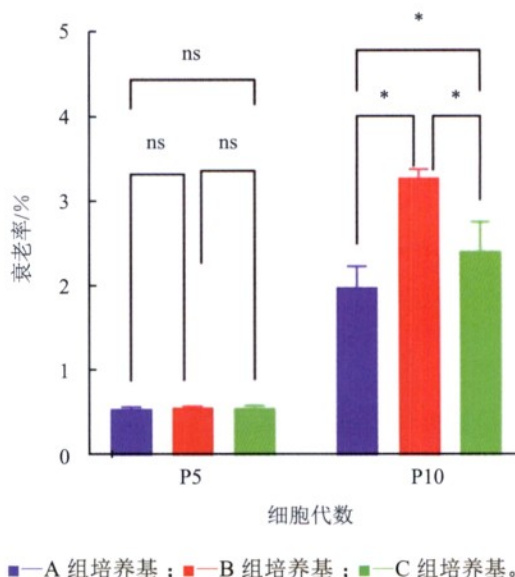


图 5 不同培养基中脐带 MSCs 的细胞衰老率 (n=3; ns 代表 P>0.05; * 代表 P<0.05)

Fig.5 Senescence Rate of Umbilical Cord MSCs Cultured in Different Media (n=3; ns Represents P>0.05; * Represents P<0.05)

2.3.8 软琼脂克隆形成检测

取3种不同培养基培养的P5和P10代MSCs收获进行软琼脂克隆形成检测^[10]。取2%琼脂糖溶液与DMEM培养基，以体积比1:1混合；每孔1.5 mL加至6孔板中，4℃冷却5 min，备用，使用前在37℃培养箱中平衡30 min。收集对数生长期的P5代MSCs，取 4×10^4 个细胞加至0.7%琼脂糖溶液(2 mL)与2×DMEM培养基(2 mL)的混合液中，混匀；每孔1 mL加至上述平衡好的6孔板中，每组3个平行孔，在4℃冷却5 min。待上层琼脂凝固后，加入1×DMEM培养基500 μL，在37℃、5% CO₂条件下培养，每隔2 d补充1×DMEM培养基200 μL，培养2~3周。固定处理后，加入0.1%结晶紫染色20 min，镜检观察。以HeLa细胞作为阳性对照。

结果显示，阳性对照组形成了典型的致密球形克隆团，表明该实验体系有效。与之不同的是，3种培养基中培养的人脐带MSCs在软琼脂克隆形成实验中仅见单个细胞或微小细胞团，均未能形成克隆。

2.4 细胞的冻存与复苏培养

冻存保护液的配制：分别取来源于A、B、C公司的培养基，按体积比为9:1加入DMSO，配制冻存保护液。

收集A、B、C组培养基所得的P2代细胞，分别置上述3组冻存保护液中进行冻存，每组冻存4支细胞，置-196℃液氮罐中保存1个月。然后取出复苏，按“2.2”项下方法培养，传代至P5代，与新鲜培养、正常传代的P5代细胞进行对比，分析含不同培养基组分的冻存保护液对细胞复苏后生长的影响。

结果表明，含不同培养基组分的冻存保护液在冷冻保护作用^[11]效果上存在明显差异。3组样本复苏后的细胞形态较新鲜培养细胞比较，均出现皱缩、易聚集成团等现象；培养1代次后，细胞形态可恢复至与新鲜细胞几无差异，呈长梭形或纺锤形，规整且大小均一。增殖能力方面(图6)，3组样本复苏、培养2代次后，其PDT均有缩短；A组培养的细胞可恢复至与新鲜培养同等水平($P>0.05$)，但B、C组培养细胞的PDT仍略高于新鲜培养水平。此外，3组冻存样本复苏培养2代次后，其中A组培养细胞的PDT保持在较低水平，表明A组冻存保护液的冷冻保护效果好，能助力细胞较快恢复至理想状态。

3 讨论

本研究深入分析了国产培养基和进口培养基对MSCs质量的影响^[12]。结果显示，在细胞形态、分化潜能、细胞表面标志物、细胞核型分析和软琼脂

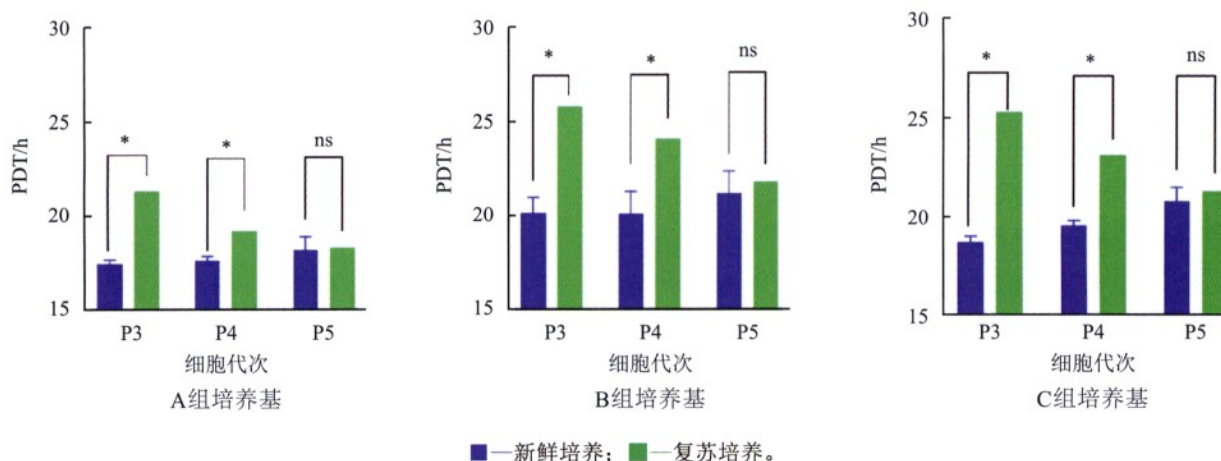


图6 不同培养基培养的脐带MSCs冻存复苏后的PDT($n=3$; ns代表 $P>0.05$; *代表 $P<0.05$)

Fig.6 PDT of Umbilical Cord MSCs after Resuscitation Cultured in Different Media($n=3$; ns Represents $P>0.05$; * Represents $P<0.05$)

克隆形成等方面, 国产培养基与进口培养基培养所得的 MSCs 无显著差异, 在增殖能力、免疫调节和细胞衰老率方面, 国产培养基显现出更大的优势。

从细胞形态来看, 3 种培养基培养所得的 MSCs 均呈长梭形或成纤维细胞样的特征, 大小较均匀, 排列也相对整齐一致。在 PDT 方面, 3 种体系的培养物则存在一定的差异; 这导致在相同时间内, 人脐带 MSCs 的最大化产量存在区别, 或在同等成本条件下产出更多高活性细胞的能力不同。在分化潜能方面, 3 种培养体系所得的 MSCs 向成骨、成脂、成软骨方向分化时的细胞分化能力稳定且相似。细胞表面标志物检测表明, 各培养基培养所得的 MSCs 均高表达典型标志物, 能维持良好干细胞特性。核型分析显示, 细胞染色体数目和结构正常。不同培养基中的 MSCs 均能有效调节免疫、抑制 T 细胞增殖, 但使用国产培养基所得的 MSCs 显示出更高的抗炎作用, 有望有效抑制炎症反应。这可能是由于不同品牌培养基的组分存在差异(如氨基酸谱系、生长因子浓度及微量元素配比等), 会显著影响免疫调节相关蛋白的表达水平。因此, 在 MSCs 的未来临床研究及应用上, 国产培养基具有更高的潜在优势。此外, 软琼脂克隆形成试验结果显示, 不同培养基培养的细胞锚定非依赖性生长能力相当。

在高代次培养条件下, 3 种培养体系中 MSCs 的细胞表型与功能未发生显著改变, 生物学特性保持良好, 传代过程稳定。PDT 随传代次数增加而逐渐延长, 且不同培养体系对 PDT 的延长幅度存在显著差异。通常情况下, 较小的 PDT 意味着培养周期更短、细胞量产速度更快。近年来, 国产培养基在细胞培养性能方面取得显著提升, 尤其在缩短 PDT 方面表现突出, 从而有效提升了细胞扩增效率。

对科研机构而言, PDT 的缩短有助于在相同时间内完成更多轮次试验, 加速科研假设的验证与成果产出。在生物制药领域, 培养周期的缩短能加快药物研发进程, 提早产品上市时间, 增强企业竞争力, 同时降低因长期培养所带来的人力与设备资源成本。尽管不同代次细胞的 PDT 存在差异, 但其增殖过程均能保持稳定, 未出现生长停滞或异常加速

现象, 反映干细胞在连续传代过程中具有良好的适应性与遗传稳定性

在干细胞长期冻存时, 常将相应培养基与 DMSO 按特定比例混合制成冻存保护液, 协同维持细胞活性。但不同培养基配制的冻存液冷冻保护效果差异显著, 含有国产培养基成分的细胞冻存液^[13], 冷冻保护作用稳定, 复苏细胞培养 1 至 2 代次后, 增殖能力可恢复至新鲜培养水平, 更利于细胞长期冷冻储存。

综上所述, 本研究为 MSCs 培养基的选择提供了有价值的参考依据; 在实际应用中, 可综合考量成本、供应稳定性等因素来筛选最适宜的培养基。国产培养基无需承担高额的国际运输费用, 也无需缴纳关税, 成本优势更为显著。然而, 本研究存在局限性, 例如仅比较了有限厂家的培养基; 未来研究可扩大范围, 纳入更多品牌和类型, 并深入探讨培养基成分与细胞质量之间的关系, 以优化配方, 提升培养效率和质量。同时, 随着干细胞研究和临床应用的不断发展, 亟待建立更严格的质量评价体系, 确保临床治疗的安全性和有效性^[14]。

参考文献:

- [1] 陈凤, 杨敏, 李彦洁, 等. 人脐带间充质干细胞的分离培养及多向分化潜能研究 [J]. 生物学杂志, 2021, 38(5): 82-85.
- [2] JIANG W, XU J Y. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12712.
- [3] ZHAO L, NI B, LI J, *et al.* Evaluation of the impact of customized serum-free culture medium on the production of clinical-grade human umbilical cord mesenchymal stem cells: insights for future clinical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 327.
- [4] 王越. 不同培养基培养的人脐带间充质干细胞生物学特性对比 [J]. 中南农业科技, 2022, 43(1): 6-8.
- [5] 任为国, 施明, 刘振文, 等. 间充质干细胞免疫调节特性与临床应用的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(10): 1151-1153.
- [6] 严泉剑, 李六金, 张宇梅, 等. 生长曲线拟合及细胞群体倍增时间的简化计算 [J]. 第四军医大学学报, 2002, (10): 923.

(下转第 1463 页)



(上接第 1411 页)

- [7] 常 铖, 刘梦婷, 张 权, 等. 长期传代培养人脐带间充质干细胞免疫调节功能的比较 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(4): 609-619.
- [8] LV F J, TUAN R S, CHEUNG K M C, *et al.* Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6): 1408-1419.
- [9] 张凌云, 刘 纓. 细胞衰老检测指标及衰老模型研究进展 [J]. 生命科学研究, 2022, 26(3): 264-270.
- [10] 齐乃松, 郭 建, 王 雪, 等. 软琼脂克隆形成实验评价药物体外抑瘤性与成瘤性 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3): 444-450.
- [11] WANG J L, LI R. Effects, methods and limits of the cryopreservation on mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 337.
- [12] 白尚星. 不同培养基对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(14): 6-8.
- [13] ZHANG M Q, ZHAO Y, WANG L, *et al.* Study of the biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells after long-time cryopreservation [J]. *Cell Tissue Bank*, 2022, 23(4): 739-752.
- [14] ULLAH I, SUBBARAO R B, RHO G J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(2): e00191.