

人脐带间充质干细胞的微生物学安全性评价*

张 权¹, 陈 恋², 饶 巍¹, 肖翠红¹, 石 亮¹, 常 敏², 张亚奇²,
乐 茜², 周端鹏¹, 王 尉¹, 贺 静², 韩 兵¹, 武栋成^{1,2△}

(1. 武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心, 武汉 430075; 2. 武汉大学基础医学院, 武汉 430072)

[摘要] **目的** 对按标准化工艺流程制备的人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)制剂进行微生物学安全性评价。**方法** 人脐带华通氏胶分离的间充质干细胞培养扩增至 P5 代。显微镜下观察细胞的形态特征, 流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达; 培养法检测细菌、真菌污染, 指示剂培养显色法和快速聚合酶链反应(PCR)法检测支原体污染, 鲎试剂凝胶法检测细菌内毒素; 胶体金法检测特定人源病毒、梅毒螺旋体; 荧光定量 PCR 法检测人乳头瘤病毒(HPV)。**结果** 按照标准化流程分离培养 hUC-MSCs 传代至 P5 代呈均一的长梭型成纤维细胞样贴壁生长, 细胞表面标志物 CD73、CD90 和 CD105 阳性率大于 98%, CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR < 2%; 受检人脐带间充质干细胞鲎试剂凝胶法检测内毒素水平小于 0.25 EU/mL, 培养检测未见细菌、真菌菌落生长, 指示剂培养显色法和快速 PCR 检测均显示无支原体污染; 胶体金法和荧光定量 PCR 法检测特定人源病毒、梅毒螺旋体和 HPV(包含 18 种高危亚型)全部为阴性结果。所有检测方法的阳性对照标本均呈阳性结果, 证实检测方法稳定可靠。**结论** 本研究采用的标准化干细胞制备工艺流程稳定可靠, 采用该工艺制备人脐带间充质干细胞符合临床应用的微生物学安全性要求。

[关键词] 质量控制; 标准化工艺流程; 人脐带间充质干细胞; 微生物学安全性

[中图分类号] R932

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)12-2003-06

Microbiological safety evaluation of human umbilical cord mesenchymal stem cells*

ZHANG Quan¹, CHEN Lian², RAO Wei¹, XIAO Cuihong¹, SHI Liang¹, CHANG Cheng²,
ZHANG Yaqi², LE Xi², ZHOU Duanpeng¹, WANG Wei¹, HE Jing², HAN Bing¹, WU Dongcheng^{1,2△}

(1. Research and Development Center, Wuhan Hamilton Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, Hubei 430075, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

[Abstract] **Objective** To conduct the safety evaluation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) prepared by the standardized technological process. **Methods** hUC-MSCs isolated by Wharton's Jelly were cultured and expanded to passage 5 (P5). The morphological characteristics of the resulting cells were observed by microscope, and the expression of cellular surface markers was detected by flow cytometry. The bacterial and fungal contamination was detected by using the culture method, the mycoplasma contamination was detected by using the indicator culture chromogenic assay and rapid PCR method, and the bacterial endotoxin was detected by the limulus reagent gel method; the specific human virus and treponema pallidum were detected by using the colloidal gold method and HPV was detected by adopting the fluorescence quantitative PCR. **Results** hUC-MSCs isolated by standardized technological process showed the homogeneous long shuttle like fibroblast like adherent growth until p5, and the positive rate of cellular surface markers CD73, CD90 and CD105 was more than 98%, which of CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR was less than 2%; the endotoxin content of hUC-MSCs in the subjects detected by the limulus reagent gel method was less than 0.25 EU/mL, no growth of bacterial and fungal colonies was found by the culture, the indicator culture chromogenic assay and rapid PCR method all showed no mycoplasma contamination; the specific human virus, treponema pallidum and HPV (containing 18 high-risk subtypes) detected by the colloidal gold method and the fluorescence quantitative PCR all had the negative results. All positive control samples of all detection methods

* 基金项目: 武汉市“3551 光谷人才计划”资助项目(武新管[2017]129 号)、武汉市科技局应用基础研究计划资助项目(2017060201010201)。

作者简介: 张权(1988-), 初级工程师, 硕士, 主要从事干细胞新药研发与应用研究。 △ 通信作者, E-mail: bcdcwu@hotmail.com。

showed the positive results, verifying that the detection method was stable and reliable. **Conclusion** The standardized stem cells preparing technological process adopted by this study is stable and reliable, adopting the technological process to prepare hUC-MSCs conforms to the requirements of clinical application microbiological safety.

[Key words] quality control; standardized technological procedure; human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs); microbiological safety

污染是细胞培养过程中长期面临的问题。造成细胞污染的因素通常包括物理、化学及生物因素等,引起细胞污染的微生物主要是细菌、真菌、支原体、病毒等。入侵的微生物在培养体系中不断增殖、代谢,消耗大量必需的养分,同时产生多种有毒的代谢产物,进一步对细胞产生毒害作用^[1]。

培养环境及环境中的污染物对体外培养的细胞产生影响,造成培养细胞生物学特性改变,并对实验结果产生潜在威胁,且随着污染时间的延长而增加,使得研究结果的真实性和可靠性大大下降。因此,对所培养细胞进行有效、可靠的微生物污染检测是十分重要的。作为一种新型的细胞治疗产品,干细胞制剂制备过程的每一环节都可能影响干细胞制剂的质量,必须对所使用的干细胞制剂的细胞质量进行相关的研究和控制^[2]。本研究对按标准工艺流程制备的人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)制剂进行微生物学安全性质量评价,为下一步组织工程与再生医学的研究提供理想的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脐带组织

新鲜脐带采集于足月健康剖宫产新生儿,由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。脐带采集前产妇产前筛查无家族遗传病史,无心血管疾病和肿瘤病史,无传染病史,乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、梅毒螺旋体(TP)检测阴性。脐带采集后 4℃ 保存,6 h 内完成华通氏胶分离培养。

1.1.2 试剂及仪器

无血清干细胞专用培养基购自美国 Lonza 公司,0.25% 胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司;荧光标记的鼠抗人 CD105-FITC、CD90-PE、CD44-PE、CD73-FITC、CD19-PE、CD14-FITC、CD34-FITC、CD45-PE 和 HLA-DR-PE 单克隆抗体均购自美国 BioLegend 公司;沙保氏琼脂平板、哥伦比亚血琼脂平板培养基均购自广州市迪景微生物科技有限公司;鲎试剂(其灵敏度标示值用 λ 表示)、内毒素工作标准品、内毒素检查用水均购自厦门鲎试剂生物科技股份有限公司;支原体分离鉴别管(培养法)混合(UU-MH)型购自珠海市银科医学工程股份有限公司;乙肝五项检测卡(胶体金法)、HCV 抗体检测试剂

盒(胶体金法)、HIV 抗体检测试剂盒(胶体金法)、TP 抗体检测试剂盒(胶体金法)均购自英科新创(厦门)科技有限公司;人巨细胞病毒抗体检测试剂盒(胶体金法)、EB 病毒抗体检测试剂盒(胶体金法)均购自北京中检安泰诊断科技有限公司;人乳头瘤病毒(HPV)核酸检测试剂盒-HPV18 型(荧光 PCR 法)购自广州安必平医药科技股份有限公司;支原体 PCR 法检测试剂盒购自上海易色医疗科技有限公司;Easy Taq DNA 聚合酶、缓冲液、dNTPs、6×DNA 上样缓冲液均购自北京全式金生物技术有限公司。

超净工作台为苏州安泰产品,电热恒温培养箱为上海精宏实验设备有限公司产品,移液枪购自德国 Eppendorf 公司,生物安全柜和细胞培养箱购自 Heal Force 公司,倒置显微镜购自重庆澳浦光电公司,离心机购自日本 KUBOTA 公司,定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,细胞培养板、离心管、移液管、培养瓶都购自美国 Corning 公司,自动细胞计数仪购自美国 Nexcelom Bioscience LLC 公司。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 的分离与培养

hUC-MSCs 的分离培养采用自主研发的分离培养方法^[3]进行。收集分离的原代 hUC-MSCs,以 2 500/cm² 的密度接种培养于无血清干细胞专用培养液中。收集第 5 代 hUC-MSCs 建库,液氮冻存备用。

1.2.2 hUC-MSCs 表面标记物测定

以收集的第 5 代 hUC-MSCs, PBS 洗涤后,制备 6×10⁶/mL 的细胞悬液。将细胞悬液按每管 100 μ L 分装,分别加入 5 μ L 不同荧光素标记的 CD105、CD90、CD44、CD73、CD19、CD34、CD45 及人类白细胞抗原 DR 位点(HLA-DR)单克隆抗体,轻微震荡混匀,避光室温孵育 30 min; PBS 洗涤 2 遍,加 500 μ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 hUC-MSCs 表面抗原标志^[4]。

1.2.3 细菌、真菌检测

参试的细胞均在无抗生素的培养皿中培养。根据细胞培养标准操作流程留样,用无菌的巴氏吸管吸取标本,分别在真菌细菌培养皿上滴成分散的几滴,做好标记。使用未做任何处理的培养皿作为阴性对照;用酒精灯烤后的接种环分别接种真菌细菌,作为阳性的对照。将已接种好的培养皿直接放入的恒温培养箱内,经 24~48 h (真菌需经 3~5 d) 培养^[5]。

定期观察培养情况并做好记录。细菌污染后培养液 pH 发生改变,肉眼可见培养板上有明显的细菌菌落或培养液变黄或变混浊;显微镜下观察能发现菌体。大多真菌污染呈白色或浅黄色小点,培养板上有明显的真菌菌落或漂浮于培养液表面,有的散在生长,镜下观察呈丝状、管状或树枝状菌丝^[6]。

1.2.4 支原体检测

应用混合型支原体能分解精氨酸产氮,使含有精氨酸肉汤培养液呈碱性而呈粉红色原理,将培养管复温至室温,做好标记。待测标本直接加入培养管内,盖上胶盖后摇匀。设置阴性及阳性对照。培养管置于 35~37 °C 恒温培养 24~48 h,观察结果。

利用 PCR 的高度灵敏度和特异性,以支原体 DNA 特异性引物检测标本是否存在支原体污染。取自换液后培养 2~3 d 且汇合度在 70%~90% 的细胞培养液的上清液 150 μL 到 1.5 mL 离心管内,1 200 r/min 离心 5 min,取上清液 100 μL 用于支原体检测。在冰上配置 PCR 扩增体系:PCR 扩增反应体系总体积 25 μL,包括 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,支原体引物和内参 2.0 μL,阳性支原体 DNA 或待测标本或阴性对照(无菌水) 2.0 μL,补去离子水至总体积 25 μL,每个标本重复 3 次。设定 PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 20 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 45 s,第 2 步至第 4 步重复 40 个循环;72 °C 充分延伸 5 min;8 °C 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并用凝胶成像系统拍照。

1.2.5 内毒素检测

按《中华人民共和国药典》^[7] 2015 年版三部通则细菌内毒素检查法中的凝胶法进行。

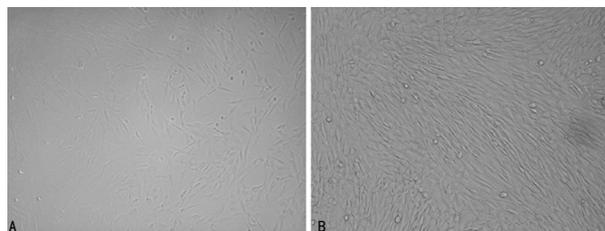
1.2.6 特定人源病毒检查

针对人脐带间充质干细胞采集和制剂制备过程中可能存在的特定人源病毒感染,首先采集脐带供者母体外周血,采用胶体金法进行快速筛选检验,主要检测指标包括乙肝五项检测、HCV 检测、HIV 抗体检测、TP 抗体检测;然后对传代培养的细胞采用荧光定量 PCR 法检测 HPV 病毒。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 的形态学观察

第 5 代次的 hUC-MSCs 均呈贴壁生长,镜下观察的细胞形态类似于成纤维细胞,呈长梭形流水状生长,见图 1。



A: 培养 3 d 后;B: 培养 7 d 后的细胞形态。

图 1 第 5 代人脐带间充质干细胞在光镜下的形态特征(×100)

2.2 hUC-MSCs 表面的抗原标志物测定

检查结果显示第 5 代次的 hUC-MSCs 的表面标志物 CD73、CD90、CD105 阳性表达率均大于 98%,CD34、CD14、CD45、CD19、HLA-DR 阳性表达率均小于 2%,见图 2。

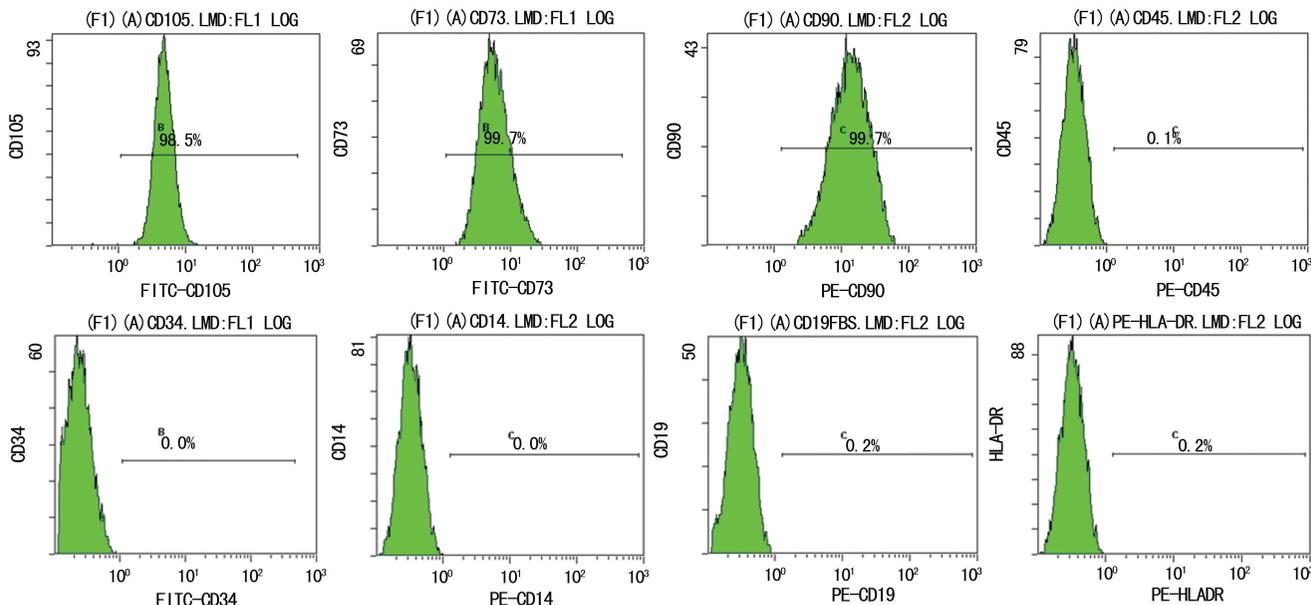


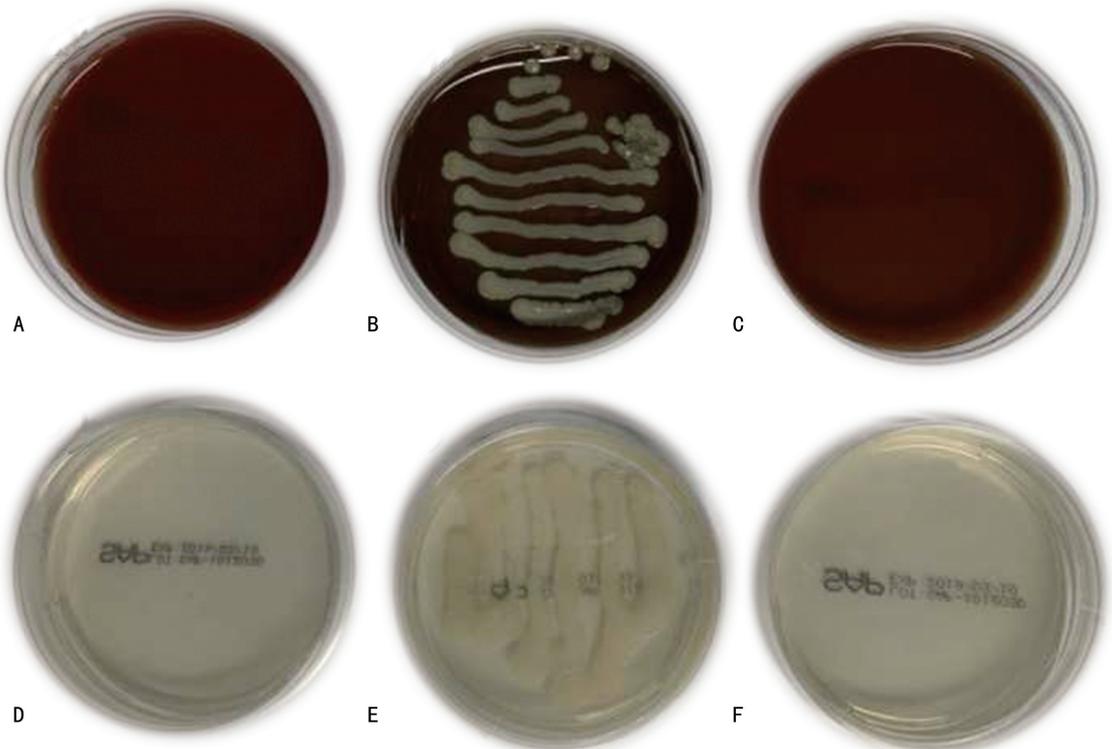
图 2 hUC-MSCs 的免疫标志物表型分析

2.3 细菌、真菌污染检测结果

根据细胞培养标准操作流程留样,用无菌的巴氏吸管吸取标本,细菌检测结果显示,hUC-MSCs 的培养基和阴性对照一样,未观察到点状的细菌,阳性对照均有明显微生物生长;真菌检测结果显示,hUC-MSCs 的培养基和阴性对照一样,未观察到真菌生长,阳性对照均有明显真菌生长,培养法检测结果均为阴性,未发现有细菌、真菌的污染,见图 3。

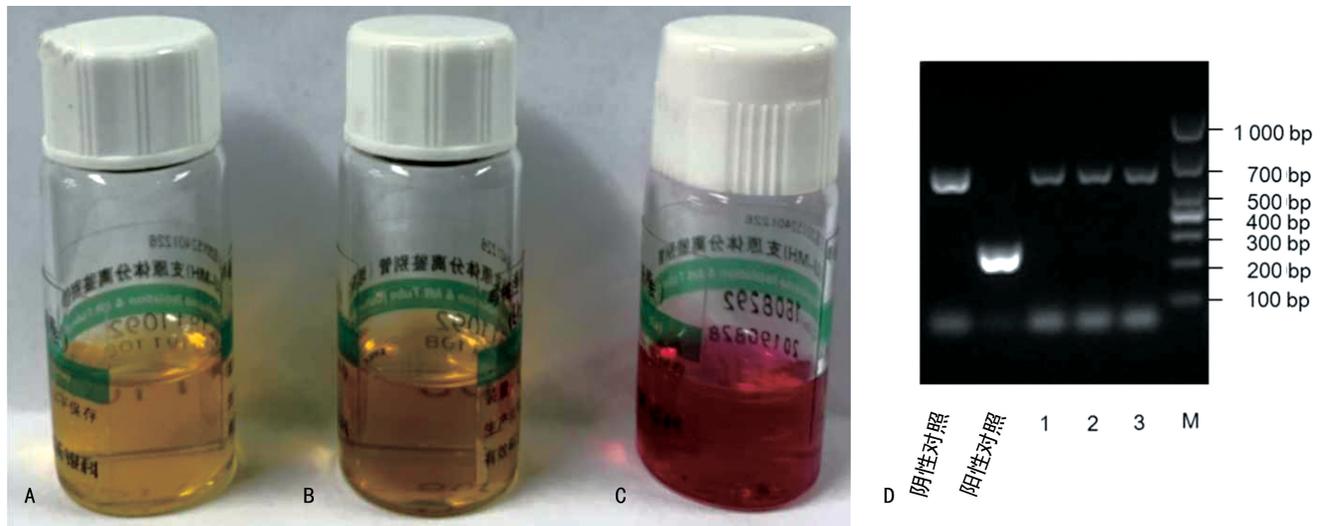
2.4 支原体检测结果

支原体指示剂培养显色法检测结果显示,阳性对照组和实验组 hUC-MSCs 的培养基颜色相差极大,可见明显差异;阴性对照组和实验组 hUC-MSCs 的培养基颜色接近。通过快速 PCR 检测法检测结果显示,实验组和阴性对照组只呈现内参条带产生,阳性组则有很亮的支原体特异条带出现。支原体指示剂培养显色法和快速 PCR 检测法检测结果均为阴性,未发现支原体污染,见图 4。



A: 细菌阴性对照为阴性; B: 细菌阳性对照为阳性; C: 细菌检测标本为阴性; D: 真菌阴性对照为阴性; E: 真菌阳性对照为阳性; F: 真菌检测标本为阴性。

图 3 细菌、真菌污染检测结果



A: 支原体阴性对照组为阴性; B: 支原体检测标本为阴性; C: 支原体阳性对照组为阳性; D: 快速 PCR 检测法检测结果。

图 4 支原体检测结果



图 5 鲎试剂法细菌内毒素检测结果

A:内毒素阴性对照为阴性,倒置后没有凝胶形成;B:内毒素阳性对照为阳性,倒置后有凝胶形成;C:内毒素阳性对照加检测标本,倒置后有凝胶形成;D:内毒素检测标本为阴性,倒置后没有凝胶形成。

2.5 内毒素检测结果

鲎试剂凝胶法对内毒素进行检测,阴性对照检测结果呈阴性,倒置后没有凝胶形成,阳性标准品对照检测结果呈阳性,倒置后有凝胶形成,标本阳性对照(阳性标准品+待测标本)检测结果呈阳性,倒置后有凝胶形成,待测标本检测结果呈阴性,与阴性对照结果一致,倒置后没有凝胶形成,见图 5。

2.6 特定人源病毒检查结果

未查出人源病毒污染,见表 1。

表 1 特定人源病毒检查结果

病毒种类	检测结果	检测方法
乙肝五项		
HBsAg	-	胶体金法
HBsAb	+	胶体金法
HBeAg	-	胶体金法
HBeAb	-	胶体金法
HBcAb	-	胶体金法
HCV	-	胶体金法
HIV	-	胶体金法
TP	-	胶体金法
HCMV	-	胶体金法
EBV	-	胶体金法
HPV	-	荧光定量 PCR 法

3 讨论

细菌类微生物污染培养液后,培养液短期内不会发生肉眼可见的变化,仅在污染后期可见浑浊、变黄、出现异味等^[8-10]。因此,对细胞培养液中的细菌类微生物进行早期检测,保障培养细胞的可用性,对医学基础实验室研究工作的顺利开展是非常重要的。真菌污染的细胞培养液颜色变黄,瓶壁可见明显块状或片状的菌落,因此一般不需特殊检测方法即可发现^[11-12]。本研究中对于无菌检测,采用了平板培养法对 3 支不同批次的 P5 代 hUC-MSCs 进行细菌、真菌快速检测,与按照药典所规定的薄膜过滤法检测结果一致,前者培养时间较后者短,在实际质检过程中可将平板培养法检测作为快速检定的方法。

细胞培养(特别是传代细胞)被支原体污染是很

普遍的问题,做好支原体污染的防治工作,是保证实验顺利进行的重要一环。支原体污染对细胞几乎所有的指标及产物均有影响,而且可以不被察觉地随着细胞的传代而传代^[13-14]。支原体污染的来源包括:所使用动物来源的一些产品如血清或已被支原体污染的细胞株/系。细胞培养上清液中支原体水平可达 10^7 /mL,而培养的细胞看起来很正常,在肉眼观察或普通光学显微镜下观察,受污染的细胞可见明显变化^[15]。有效地检测支原体污染之所以是细胞实验成功的关键所在,是因为体外培养的细胞被支原体污染后,几乎所有的指标及产物均受其影响^[16]。关于支原体的检测,药典规定直接培养法和细胞指示法,前者检测时间为 28 d,后者检测时间虽没有前者长,也需 7~10 d,但其操作相对复杂;本研究采用支原体指示剂培养显色法,同时采用快速 PCR 检测法检测支原体,快速、简便、结果重复性好,且二者检测结果一致,均为阴性。

细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁外层上的特有的结构,其化学成分为脂多糖(LPS)。内毒素作用于人体细胞,可导致热源反应,引起包括发热、寒战、肌痛、恶心、呕吐、头痛、血压下降等中毒症状^[13]。本实验对 P5 代 hUC-MSCs 采用鲎试剂凝胶法对内毒素进行检测,结果表明受检人脐带间充质干细胞内毒素水平低于 0.25 EU/mL,符合药典规定标准。

被病毒感染也是 hUC-MSCs 培养过程中常见的微生物污染途径。hUC-MSCs 培养过程中可能由于内源性病毒、外源性病毒、或滤过性病毒导致病毒污染^[13-17]。内源性病毒主要由原代细胞带入,外源性病毒污染是生产过程中最主要的污染途径,可以通过被感染的生物组织制成的生物制品和试剂的加入导致感染,也可能由于操作工艺不当导致感染,且病毒污染往往需要根据病毒的具体种类建立参照系统,选择独立检测方法进行检测,普通实验室不易具备相应的设备条件,且病毒污染与前两种病原体污染相比较少见^[18]。对于细胞特定人源病毒的检测,采用了胶体金法和荧光定量 PCR 法两种方法,分别从蛋白水平及基因水平对人源特定病毒进行检测,胶体金法检测结果显示采集标本无特定人源病毒(HIV、HBV、HCV、HCMV、EBV)及 TP 感染,P5 代 hUC-MSCs 荧光定

量 PCR 法检测传代细胞 HPV 病毒(包含 18 种高危亚型)的检测结果均为阴性,提示实际质检过程中可以结合两种方法进行检定。

本研究采用标准化工艺流程制备的干细胞制剂,证实了干细胞制剂安全性及工艺流程的可靠性。采用传统的检测方法对干细胞制剂的细菌、真菌、支原体、内毒素及病毒污染进行检测,同时,引入快速、可靠的检测细菌、真菌、支原体和病毒的方法,如检测细菌、真菌引入的平板培养法,检测支原体指示剂培养显色法外,引入快速 PCR 检测法,检测 HPV 病毒采用的荧光定量 PCR 法,这些方法可全面、可靠判断细胞制剂的微生物学安全性,减少临床应用风险,为 hUC-MSCs 临床应用的微生物安全性提供高质量的检测措施,并为组织工程与再生医学的研究提供参考。

参考文献

- [1] 周梦怡,勇强,徐莉. 细胞培养无菌技术及有效控制污染的措施[J]. 实验与检验医学,2016,34(4):477-479.
- [2] 姚惟琦,武栋成. 一种人脐带间充质干细胞分离培养方法:中国,201110261543. 5[P]. 2016-12-14.
- [3] 张权,张亚奇,饶巍,等. 长期传代培养对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2019,41(1):42-52.
- [4] 中国医药生物技术协会. 干细胞制剂制备质量管理自律规范[J]. 中国医药生物技术,2016,11(6):481-490.
- [5] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:57-58.
- [6] RASHEED M A, QI J, ZHU X F, et al. Comparative genomics of mycoplasma bovis strains reveals that decreased virulence with increasing passages might correlate with potential virulence-related factors[J]. Front Cell Infect Microbiol,2017,7(2):177.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009:76-77.
- [8] 邢龙彬,刘长政,焦晓磊,等. 细胞培养过程中支原体污染的防治与检测方法[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(10):1557-1564.
- [9] AOI T, STACEY G. Impact of National and international stem cell banking initiatives on progress in the field of cell therapy IABS-JST joint workshop: summary for session 5[J]. Biologicals,2015,43(5):399-401.
- [10] 杨丽华. 细胞培养中细菌类微生物污染的快速检测[J]. 医药前沿,2014,4(16):315-315.
- [11] VERSTOCKT B, DELEENHEER B, VAN ASSCH E G, et al. A safety assessment of biological therapies targeting the IL-23/IL-17 axis in inflammatory bowel diseases[J]. Expert Opin Drug Saf,2017,16(7):809-821.
- [12] 余一海,陈耀,石星亮,等. 微滴单细胞培养技术应用于白色念珠菌培养的研究[J]. 热带医学杂志,2018,18(7):886-890.
- [13] PATRICIA G, BEATRIZ C, MARIA B, et al. Standard requirement of a microbiological quality control program for the manufacture of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Stem Cells Dev,2014,10(23):1074-1083.
- [14] 施梅,全立卿,王丹飞. 细菌内毒素法和热原法检测顺铂注射液的比较试验[J]. 海峡药学,2017,29(12):85-87.
- [15] 傅超毅,高毅,彭青,等. 多种方法去除人肝癌细胞系 C3A 支原体污染效果及比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(10):766.
- [16] HUANG C, LONG X, JING S, et al. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections and semen quality in 19,098 infertile men in China[J]. World J Urol,2016,34(7):1039-1044.
- [17] RATLIFF A E, DUFFY L B, WAITES K B. Comparison of illumigene (R) mycoplasma DNA amplification assay and culture for detection of mycoplasma pneumoniae[J]. J Clin Microbiol,2014,52(4):1060-1063.
- [18] 李宏英. 兽药 GMP 厂房内污染原因及防控措施[J]. 江西畜牧兽医杂志,2013,33(6):63-64.

(收稿日期:2019-12-14 修回日期:2020-02-24)