

用于细胞疗法的间充质干细胞的实时质量控制与功能评估

作者

Diana Guimet 博士
Can Jin 博士
Yama A. Abassi 博士
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣地亚哥

摘要

利用 Agilent xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 仪器开发了用于骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 功能评估的无标记分析方法。这种无损伤方法可实现生理相关条件下细胞状态的连续读数。从这些数据中可获得多种定量参数，用于表征 BMSCs 并评估细胞的效价和功能^[1]。这组动力学参数能够有效评估 BMSC 功能（即分化潜能），并可作为临床前质量控制评估的工具。

前言

间充质干细胞 (MSCs) 在再生医学领域备受关注，其原因在于：

- 它们可以在体外或体内分化为脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞，用于组织修复^[2]
- 在单独使用或与其他治疗方法配合使用时，可抑制免疫排斥和炎症反应

为产生用于临床前研究的 MSCs，供体细胞必须在体外进行几次传代。由于连续传代会降低增殖速率并导致分化潜能的丧失，再加上不同供体间功能差异可能较大，因此评估细胞在扩增过程中和扩增后的功能至关重要^[3]。

目前，全世界有 650 多项使用骨髓 MSCs (BMSCs) 的临床试验，II 期试验涵盖骨关节炎和脊髓损伤，以及心肌梗死和神经系统疾病^[4]。然而，由于缺乏细胞间的一致性和质控 (QC) 标准，导致结果失败或错误解读，从而阻碍了该领域的进展。研究表明，国际细胞治疗协会 (ISCT) 于 2006 年设定的用于定义 MSCs 的最低标准不能预测干细胞效价^[5,6] (表 1)。当前的分析手段缺乏实时定量检测细胞质量的能力，同时无法提供功能表征和产品质量参数的评估，例如活力、纯度和效价^[7]。

表 1. ISCT 规定的表征 MSCs 的最低标准^[6]

特征	参数
粘附	在分离步骤中粘附于塑料组织培养板/培养瓶，以区别于非粘附污染细胞
阳性标记： CD73、CD90、CD105	通过流式细胞仪测得 $\geq 95\%$
阴性标记： CD45、CD34、CD14 或 CD11b CD79a 或 CD19、HLA-DR	通过流式细胞仪测得 $\leq 2\%$
分化潜能	由分化的成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞的染色确定

利用细胞阻抗分析 MSC 增殖

Agilent xCELLigence RTCA 阻抗分析的功能单元是一组嵌入微孔板 (Agilent E-Plate, 图 1) 底面的微金电极生物传感器。当浸入介质中时，在这些电极上施加弱电压会使电流在其间流动。由于这种现象依赖于电极与整体溶液的相互作用，因此在电极-溶液界面处贴壁细胞的存在会

阻碍电流流动。阻抗的大小取决于细胞数量、细胞大小、细胞-基质粘附强度以及细胞-细胞粘附 (屏障功能)。当将来自不同供体、不同传代数或不同培养条件的 BMSCs 接种于 E-Plate 时，通过实时阻抗信号捕获并定量细胞状态与特性存在的差异，从而实现严格且高度可重复的细胞表征。

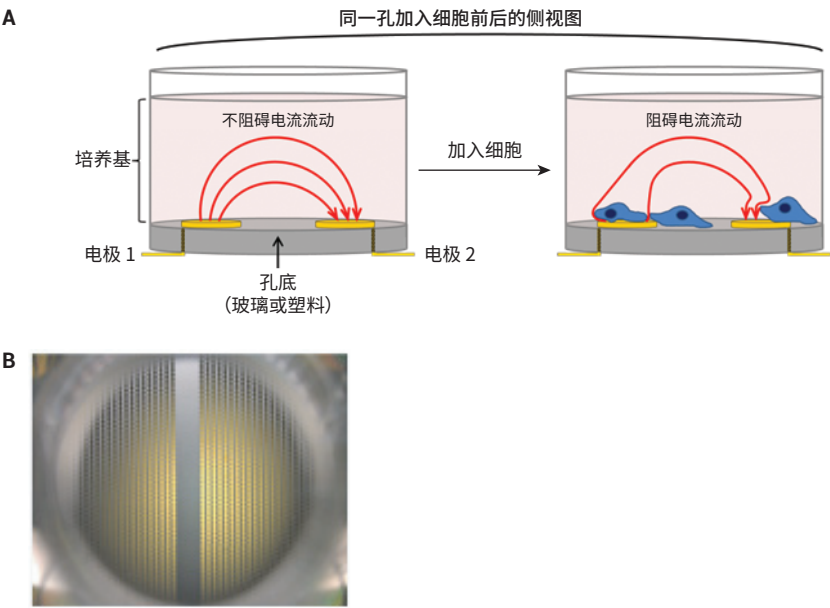


图 1. 细胞阻抗分析原理概览。(A) Agilent xCELLigence 电子微孔板 (E-Plate) 中单孔的侧视图。在没有细胞的情况下，电流自由地通过培养基，形成了电极之间的电路。由于细胞在生物传感器上粘附并增殖，电流的流动受到阻碍，从而提供了细胞数量、细胞大小、细胞-基质粘附强度以及细胞-细胞粘附 (屏障功能) 的高灵敏度读数。注：未按比例绘制。(B) E-Plate 单孔的俯视图。不同于 A 图的简化示意图，电极实际上是一个交错阵列，覆盖了超过 70% 的孔底面积。虽然在微金电极生物传感器表面也可以观察到细胞，但孔中间无生物传感器分布的区域更有利于显微镜成像

方案：使用 xCELLigence RTCA 研究 MSCs

Agilent xCELLigence 仪器

本研究中的所有阻抗实验均使用安捷伦 96 孔电子微孔板 (E-Plate 96) 通过 xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 多板 (MP) 仪器进行, 该仪器置于维持 37 °C 温度设定, 并通有 5% CO₂ 的标准组织培养箱中。所有测试均进行 6 次生物学平行分析。将 xCELLigence 仪器记录的阻抗值转化为细胞指数 (CI), 该参数被定义为 $(Z_n - Z_b)/15$, 其中 Z_n 和 Z_b 分别为存在和不存在细胞时的阻抗值。

细胞、培养基和实验细节

在比较不同生长条件的实验中, 将来自同一供体的细胞在含有 7% FBS (血清) 的 MSC 基础培养基中培养两代, 从而在解冻后活化细胞。从第 4 代 (P4) 开始, 依次让细胞在 T75 培养瓶中的含血清培养基、无血清培养基 (SFM) 或 SFM 无外源物质 (XFM) 中传代。对于在 SFM 或 XFM 中生长的细胞, 所有培养板和培养瓶均采用 Cellstart 基质 (Thermo Fisher) 包被。每两次传代, 将一部分细胞接种至 E-Plate, 然后使用 xCELLigence 仪器对其附着和生长情况进行至少 10 天的检测。采用以下数据采集方案: 每 30 秒读取一次, 持续 8 小时, 然后每 15 分钟读取一次, 持续 16 小时, 最后每小时读取一次, 持续 400 小时。每两到三天更换一次培养基。

为评估供体之间的差异, 细胞购自 ATCC、Thermo Fisher 和 Lonza 三家供应商。选择的供体 (分别命名为供体 1、供体 2 和供体 3) 能够代表不同的年龄、性别和种族。将来自所有三个供体的细胞在 XFM

中培养, 并按上述方式进行繁殖, 每次传代均冻存一份细胞。为表征这些样品, 将来自多代的细胞同时解冻, 并在 T75 培养瓶中恢复。当细胞达到约 80% 融合时, 将其接种至 E-Plate 中, 并如上所述检测细胞生长情况。

在评估分化潜能的实验中, 使用 StemPro 分化试剂盒 (Thermo Fisher) 诱导选定传代细胞分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞, 然后根据制造商的说明进行染色。

对于 BMSCs 的表型表征, 在 PBS + 10% FBS 中对细胞进行洗涤, 并用一组抗体 (图 4 和图 6 的 E 和 K) 染色 30 分钟。

用 PBS + 1% FBS 洗涤后, 将细胞复溶于 PBS + 1% FBS 中, 并使用 NovoCyte 流式细胞仪进行分析。

定义用于质量控制的定量参数

细胞指数倍增时间

RTCA 软件根据生长曲线的对数期 (图 2, 曲线 A, CI_{DT}) 计算细胞指数倍增时间 (CI_{DT})。 CI_{DT} 是细胞增殖和行为的读数结果, 它综合了细胞数量、粘附强度和形态的变化。在图 2 的示例中, 细胞 B (时间更长) 的 CI_{DT} 比细胞 A 的更大, 表明细胞 A 的行为变化速度比细胞 B 更快。

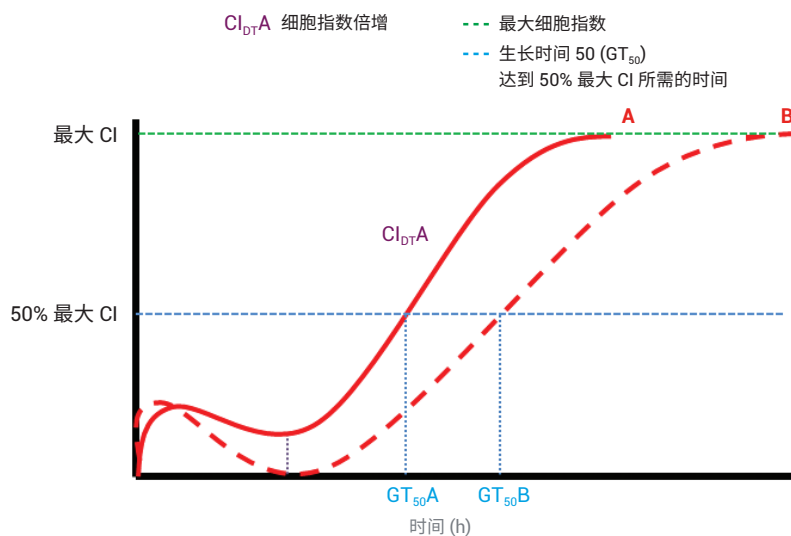


图 2. 由 RTCA 生长曲线获得的定量参数汇总。比较细胞系 A 和细胞系 B 的代表性生长曲线。图中显示了最大 CI (CI_{max}) 和 50% 最大 CI (GT_{50}) 的计算方式 (蓝线)。 CI_{DT} 表示 CI 翻倍所需的时间 (红色实线), 针对整个对数生长期进行计算

最大细胞指数和最大相对 CI

最大 CI (CI_{max}) 表示细胞达到完全融合和最大粘附强度时的细胞指数 (图 2)。将第一次传代中的最大 CI 设为 1.0, 并分析所有连续传代作为相对变化, 称为最大相对 CI (RCI_{max}), 以说明在第一次实验传代后 CI_{max} 发生的任何变化。

生长时间 50

生长时间 50 (GT_{50}) 是指 MSCs 达到 50% CI_{max} 所需的时间。 GT_{50} 可用于比较多种细胞类型的增殖速率, 或相同细胞类型的不同接种密度。例如, 在图 2 中, 两种细胞达到相同的 CI_{max} , 但是细胞 A 的 GT_{50} 比 B 细胞的更快, 表明其增殖速率更高。为说明在第一次实验传代后 GT_{50} 的任何变化, 可以绘制多代的 GT_{50} , 并可以使用 Excel 以外的其他方法计算斜率, 以表示 GT_{50} 随时间的变化 (图 3C)。

表 2. 用于质量控制的定量参数

参数	定义	阈值*
CI_{DT}	细胞指数倍增时间	$CI_{DT} \leq 50$
RCI_{max}	最大相对细胞指数	$RCI_{max} \geq 0.8$
GT_{50}	达到 50% CI_{max} 所需的时间	参见斜率
S	GT_{50} 随时间变化的斜率	$S < 6$

* 与正向分化潜能相关的阈值。

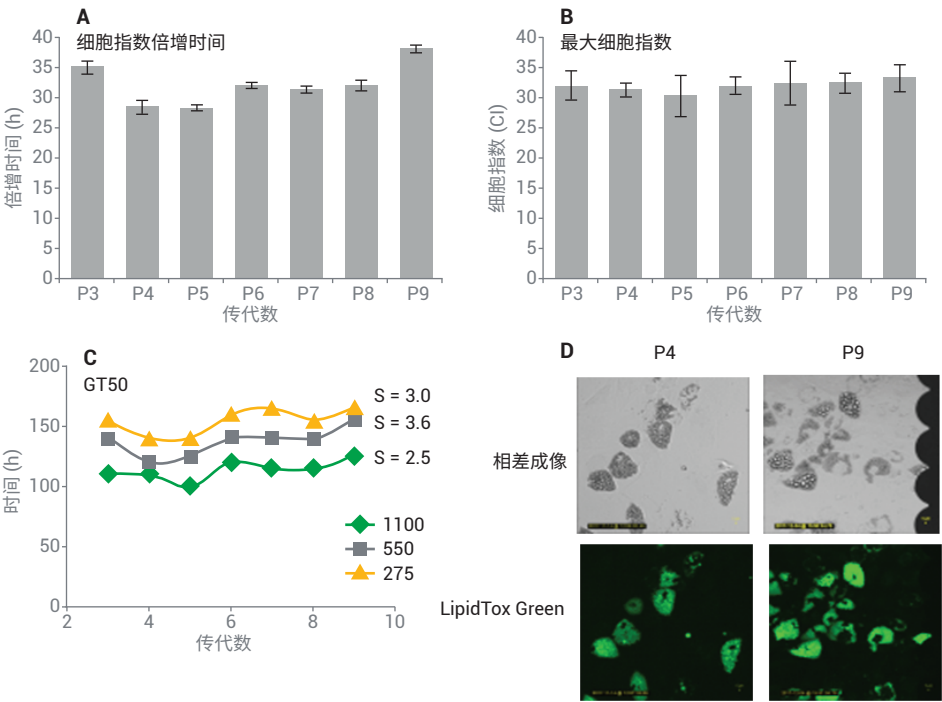


图 3. 对于功能性 BMSCs, 定量参数可重复且始终保持一致。将 BMSCs 在含血清培养基中繁殖 12 代, 并在每次传代的不同实验日期将一部分细胞样品接种至 Agilent E-Plate。诱导细胞在第 4 代、第 6 代和第 9 代分化, 以检查其功能。(A) 不同传代数下 CI 倍增时间; (B) 不同传代数的 CI_{max} ; (C) 不同传代数的 GT_{50} 。计算每个接种密度 (275、550 或 1100 个细胞/孔) 的斜率 (S), 作为随时间变化的衡量指标。(D) 在脂肪形成分化培养基 (D) 中培养 14 天后进行 LipidTox Green 脂肪染色处理

结果与讨论

定量 xCELLigence 参数始终保持一致并可重复

最近的研究结果表明, BMSCs 在多次传代后增殖速率降低, 这与分化潜能的丧失有关^[2]。出现这种功能丧失的确切传代数根据细胞供体和生长条件的不同存在显著差异, 目前尚无标准质量控制方法可以对该阶段进行表征。

我们试图建立可测量的定量参数, 并将其与已知标准品进行比较, 从而预测功能丧失。经含血清培养基培养的来自供体 1 的 BMSCs 在 T75 培养瓶中繁殖了 14 代, 将每次传代的样品保存于液氮中。将不同传达数的代表性细胞解冻, 然后接种至 E-Plate, 并通过 RTCA 进行检测。结果表明, CI_{DT} (图 3A)、 CI_{max} (图 3B) 和 GT_{50} (图 3C) 三个参数在连续传代至 P9 期间均保持一致。最大 CI 和 CI_{DT} 与平均值的最大偏差分别为 5.2% 和 10.5%。 GT_{50} 随时间变化的斜率接近 0 (各接种密度的 $S = 2.5$ 、 3.0 和 3.6), 表明生长速率几乎没有变化。对三个细胞谱系都测试了传代至 P9 的分化功能。P4 和 P9 BMSCs 经 LipidTox Green 脂肪染色显示阳性染色, 表明其可成功分化为成熟的脂肪细胞 (图 3D)。P4 和 P9 也表现出类似的分化为骨细胞和成软骨细胞的能力 (数据未显

示)。连续传代代表了在三个月期间进行的实验。只要细胞仍然保留分化能力, RTCA 测试得到的定量参数即保持一致, 表明该 RTCA 分析稳定且可重复。

BMSCs 培养试剂的质量控制评估

为评估在不同培养条件下繁殖的 BMSCs, 比较了在含血清培养基 SFM 和 XFM 中扩增的早期 (P4)、中期 (P9) 和晚期 (P12) 传代细胞的生长动力学。图 4 将在 SFM 中生长的细胞 (图 4A–F) 与在 XFM 中生长的细胞 (图 4G–L) 进行了结果比较。动力学生长曲线表明, 培养在 SFM 中的 P9 细胞已停止增殖 (图 4A), 培养在 XFM 中的细胞则继续增殖超过 P9 (图 4G)。

综合经验观察和上述基于定量 xCELLigence 参数的详尽分析, 为各动力学参数 (CI_{DT} 、 CI_{max} 和 GT_{50}) 设置了阈值, 用于评估细胞的分化潜能 (表 2)。数据表明, 当 CI_{DT} 大于 50 小时, 分化潜能丧失。这种现象可见于在 SFM 中生长的 P9 细胞 (图 4C 和图 4F), 以及在 XFM 中生长的 P12 细胞 (图 4G 和图 4L)。类似地, 当 RCI_{max} 小于 0.8, 且至少一个接种密度下 GT_{50} 的 $S > 6$ 时, BMSCs 的分化能力减弱 (图 4C、4D、4E、4I、4J 和 4L)。值得注意的是, 表 2 中所示的源自 xCELLigence 的动力学参数/阈值的预测都通过表型染色 LipidTox Green 检测得到了证实。培养在 SFM 中的细胞失去

了 P4 和 P9 之间的分化潜能 (图 4F), 而培养在 XFM 中的细胞则保留有超过 P9 的分化潜能 (图 4L)。

如需确定发生功能丧失的传达数, 用户可以计算不同时间间隔 (传达数编号) GT_{50} 的 S 值。以培养在 XFM 中的细胞为例, 当细胞接种密度为 1100、550 和 275 个细胞/孔时, 对于 P4–P12 的宽时间窗, 计算得到的 S 值分别为 4.7、6.6 和 30 (图 4J)。以更精细的时间增量将这种斜率分析进行分解, 可以准确揭示发生功能丧失的传达数。对于不同的细胞接种密度, P4–P9 的 S 值分别为 2、4 和 4。由于 $S < 6$, 很显然, P9 细胞仍然具备分化功能。相比之下, 对于不同的细胞接种密度, P9–P12 的 S 值分别变为 10、11.7 和 67 (数据未显示)。这些动力学参数清楚地表明, P9 后 XFM 细胞的分化功能丧失, 与 LipidTox Green 分析结果一致。

在不同的生长条件下, 对多次传代进行 BMSC 表面标记表型分析。所获结果与之前的研究结果一致, 即 ISCT 规定的用于定义 BMSCs 的最低标准不能预测其功能^[4,5]。XFM 中生长的 BMSCs 在处于 P12 时尽管显示功能完全丧失 (图 4L), 却表现出正常表型 (图 4K) 的事实体现了这一点。我们提出, 通过整合 xCELLigence 测试所获的三个定量参数, 用户可以更准确地识别功能丧失。

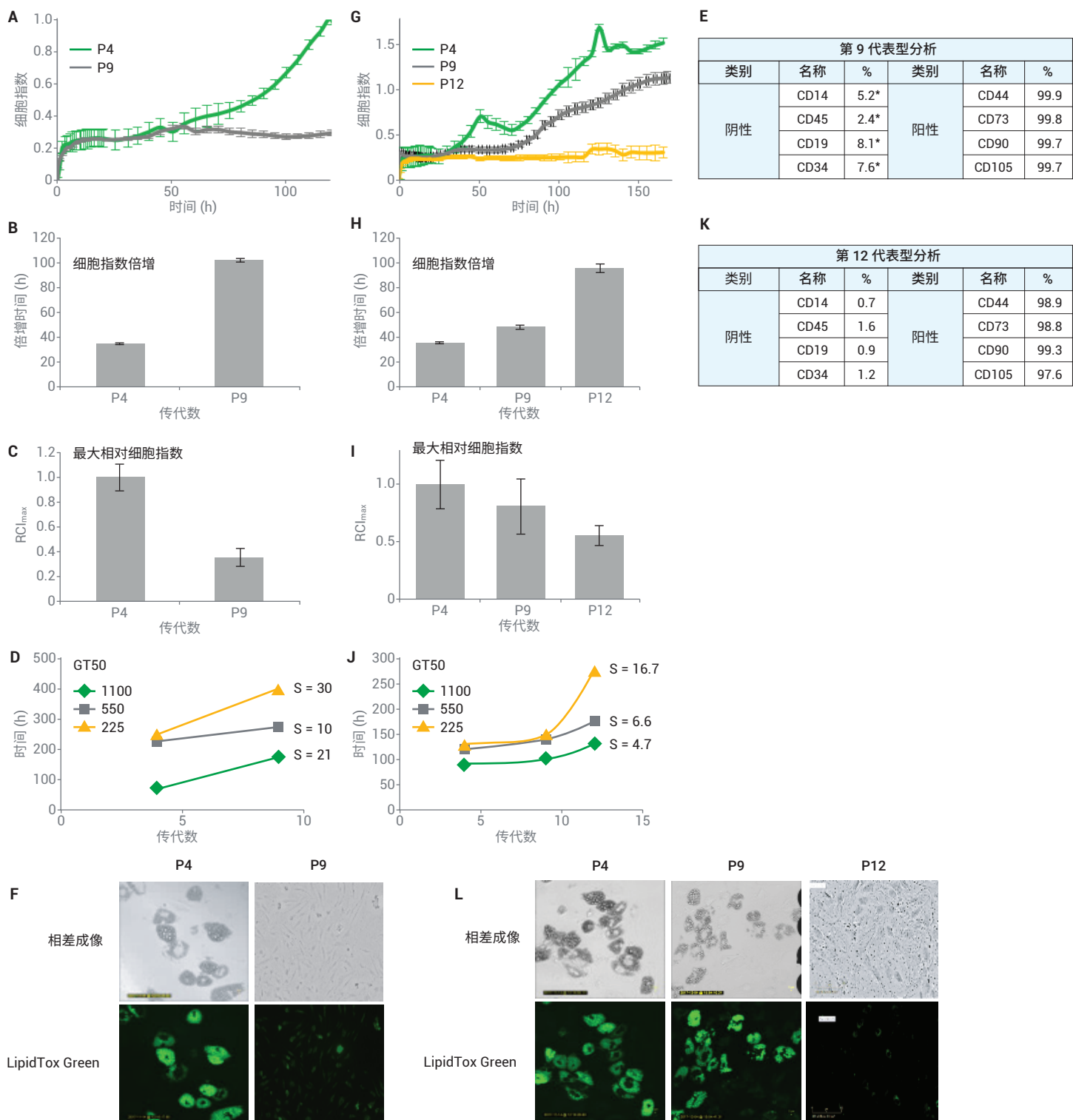


图 4. 不同培养条件下 BMSCs 的质量控制评估。将 BMSCs 在无血清培养基 (A–F) 或无外源物质无血清培养基 (G–L) 中繁殖 14 代，然后通过 Agilent xCELLigence 仪器分析一组不同传代数细胞样品的定量参数。(A 和 G) 比较各种生长条件下早期和晚期传代数细胞的生长曲线。如方案中所述，使用 RTCA 软件计算细胞指数倍增时间 (B 和 H) 和相对 CI_{max} (C 和 I)。虚线表示设定的功能状态阈值。(D 和 J) 确定连续传代的 GT_{50} 。计算的斜率 (S) 表示三种不同接种密度 (E 和 K) 下随时间的变化。在观察到功能丧失的指定传代数中，阴性和阳性 MSC 标记的表型分析。* 表示超过表 1 中所列设定阈值的值。(F 和 L) 将指定的传代数在脂肪形成分化培养基中培养 14 天后，用 LipidTox Green 脂肪染色进行分化染色

供体间差异的质量控制评估

上述 QC 参数和规定的阈值（表 2）还用于评估供体之间的差异，并确定 RTCA 分析是否可以评估不同来源 BMSCs 的功能丧失。将从不同供体获得的 BMSCs 在 XFM 中繁殖至少 12 代，并通过 RTCA 对其进行分析。图 5 中 P2、P6 和 P10 细胞生长曲线的代表性结果表明，不同供体之间的增殖存在明显差异。供体 3 在 P10 继续增殖（图 5C），而供体 2 和供体 1 的增殖速率分别在 P6 和 P10 前开始降低（图 5A、

图 5B）。具体而言，供体 2 在 P6 之前的 $Cl_{DT} > 50$ （图 6B）， $RCl_{max} < 0.8$ （图 6C），并且 GT_{50} 的 S 值大于 6（图 6D），这表明供体 2 到此传代数功能丧失。

相反，对于供体 3，三个参数在 P6 前符合要求的阈值（表 2），到 P12 则不符合（图 6H、6I 和 6J）。由 xCELLigence 分析获得的功能 QC 数据通过供体 2 在 P6 中缺乏脂肪细胞染色得到了证实（图 6F）。相比之下，对于供体 3，我们在 P6 成功观察到成熟脂肪细胞染色，但在 P12 则

未观察到此现象（图 6L）。表型干细胞表面标记分析表明，与 RTCA 和分化结果一致，来自供体 2 和供体 3 的 BMSCs 分别在 P6 和 P12，四种标记中仅三种的阴性标记表达大于 2% 的限值（图 6E 和图 6K）。但是，在这些特定的传代数中，阳性 MSC 标记的表型表达几乎没有变化。对于供体 2，直到 P8 为止，未观察到阳性标记表达的变化（数据未显示），这进一步印证了由于 P6 时细胞功能的丧失，这些传统指标可能无法预测 MSC 效价。

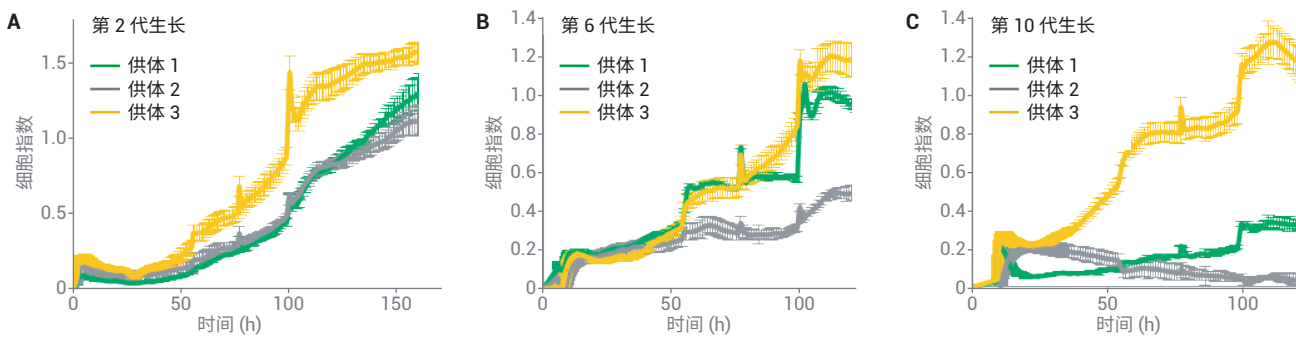


图 5. 来自三种不同供体的 BMSCs 在多次传代过程中的实时动力学曲线图显示了生长潜能的显著差异。来自不同供体的 BMSCs 在无外源物质培养基中繁殖 12 代后，将各传代数的一部分细胞样品接种至 Agilent E-Plate，并检测 10 天。比较三种供体的第 2 代 (A)、第 6 代 (B) 和第 10 代 (C) 代表性生长曲线

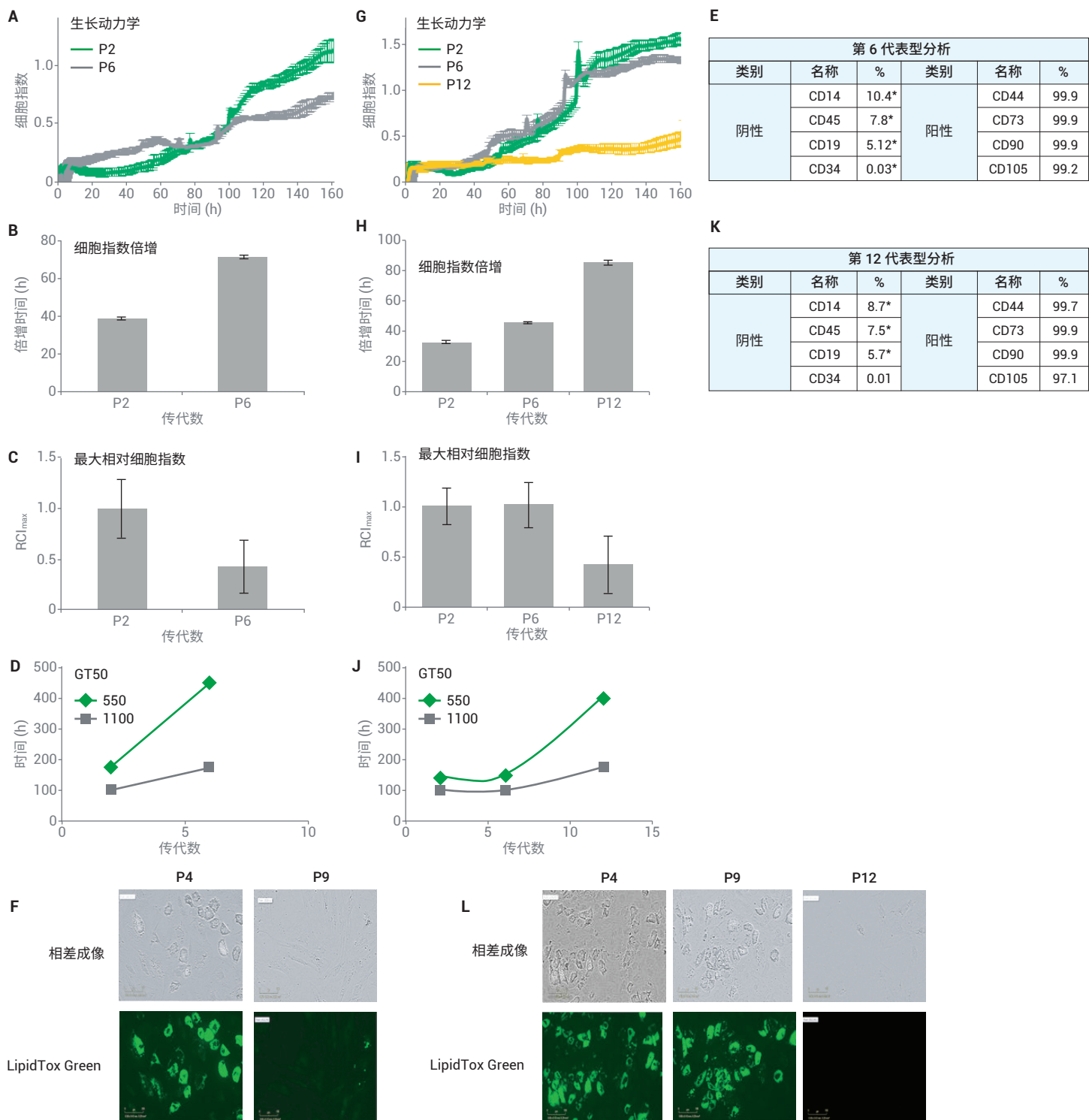


图 6. 供体间 BMSCs 差异的质量控制评估。将来自图 5 中供体 2 (A-F) 和供体 3 (G-L) 的 BMSCs 在无外源物质无血清培养基中繁殖 12 代，然后通过 Agilent xCELLigence 仪器分析一组不同传代数细胞样品的定量参数。(A 和 G) 比较各种生长条件下早期和晚期传代数细胞的生长曲线。如方案中所述，使用 RTCA 软件计算细胞指数倍增时间 (B 和 H) 和相对 CI_{max} (C 和 I)。虚线表示设定的功能状态阈值。(D 和 J) 计算连续传代的 GT_{50} ，并针对两个接种密度制图。计算的斜率 (S) 表示各接种密度下随时间的变化。(E 和 K) 在观察到功能丧失的指定传代数中，阴性和阳性 MSC 标记的表型分析。* 表示超过表 1 中所列设定阈值的值。(F 和 L) 将指定的传代数在脂肪形成分化培养基中培养 14 天后，用 LipidTox Green 脂肪染色进行分化染色

结论

当前，细胞治疗领域（尤其是 MSCs）的 QC 分析缺乏可靠标准，无法在不降低生产率的情况下实时快速、定量地表征细胞。因此，高变异性和缺乏细胞间一致性持续限制了 MSCs 的应用。xCELLigence RTCA 可提供 MSCs 的功能评估。RTCA 分析仅需要一小部分细胞（有助于最大程度提高产量），并可以在细胞增殖/分化过程中的任何时候进行分析，或者可先将细胞冷冻保存，将来再进行分析。从动力学增殖分析中获得的生物学相关参数在多次传代中保持一致，并且细胞可继续增殖并分化为各自的谱系。正如供体间差异实验中所观察到的结果，未能达到这组功能值的定量标准表明分化潜能丧失（图 6）。这种基于 xCELLigence 的 QC 分析法可用于表征生长培养基、传代数 and 批次一致性导致的差异。

参考文献

1. Torre, M. et al. GISM, Ex Vivo Expanded Mesenchymal Stromal Cell Minimal Quality Requirements For Clinical Application. *Stem Cells Dev.* **2015**, 24(6), 677–685
2. Panchalingam, K. M. et al. Bioprocessing Strategies for the Large-Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells: A Review. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, 23, 225
3. Sensebr, L.; Bourin, P.; Tarte, K. Good Manufacturing Practices Production of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Hum. Gene Ther.* **2011**, 22(1), 19–26
4. <https://ClinicalTrials.gov>
5. Samsonraj, R. M. et al. Establishing Criteria for Human Mesenchymal Stem Cell Potency. *Stem Cells* **2015**, 33, 1878–1891
6. Dominici, M. et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, 8(4), 315–317
7. Hunsberger, J. et al. Manufacturing Road Map for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Technologies. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, 4, 130–135

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 11 月 1 日，中国出版
5994-1067ZHCN
AN 19
DE.5715046296

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn