

## • 新药论坛 •

## 间充质干细胞的研究进展与药学评价

卢加琪, 韦 薇, 刘伯宁, 罗建辉\*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**摘要:** 截至2018年12月, 世界范围内有900余个间充质干细胞 (mesenchymal stem/stromal cell, MSC) 研究项目正在开展或完成了临床研究, 其数量一直占据各类干细胞疗法临床试验数量的第1位。近年来国内多个间充质干细胞产品开展了非注册临床研究, 并开始按照药品申报临床试验。科学界对间充质干细胞的生物学功能及临床治疗效果在不断认知积累中, 其体外培养观测到的功能受到体内实际生存环境的限制未能充分显现。不同组织来源间充质干细胞的培养方法、传代代次、细胞表型和功能均有差异, 且制剂工艺、临床给药方式和剂量也显著影响临床疗效。间充质干细胞的体外培养条件、诱导方式与回输人体后微环境的差异性, 使产品中的细胞难以保持分离前的原始状态。因此, 间充质干细胞的来源、制备工艺和复杂性、多样性、变异性等特点, 及其存在争议的定义和功能, 也给按照药品审评审批带来了挑战。本文综述了国内外间充质干细胞的药物研发进展和临床研究现状, 讨论了间充质干细胞的生产原材料、生产工艺、质量研究等药学评价要点, 以期为国内间充质干细胞产品的药学评价提供参考。

**关键词:** 间充质干细胞; 临床研究; 生产工艺; 质量控制; 药学评价

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1317-08

## Research progress, chemistry, manufacturing and controls considerations of mesenchymal stem cell products

LU Jia-qi, WEI Wei, LIU Bo-ning, LUO Jian-hui\*

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**Abstract:** The number of clinical trials for mesenchymal stem cell (MSC) products ranked the top among all stem cell products, with more than 900 trials ongoing or completed by 2018. In China, many MSC clinical trials have started as "the third type of medical technique" and the dossiers of MSC products have been submitted to National Medical Products Administration (NMPA). The biological function and therapeutic effect of MSCs are constantly being recognized in scientific communities. However, the observed functions of MSCs *in vitro* are not fully reproduced in the living microenvironment *in vivo*. There are substantial variations among tissue origins, cellular phenotypes and biological functions. Different formulations, delivery methods, manufacture processes or doses all greatly affect the clinical efficacy. It is difficult for MSCs to maintain the naive state due to the differences between *in vitro* culture conditions and *in vivo* microenvironment. Meanwhile, there is no widely accepted scientific definition for MSCs until now, due to the complexity of manufacturing process and variable sources. Consequently, the regulation of MSC products is a challenge for drug administrative agencies. In this article, we review the research progress of MSC products around the world, and summarize the considerations in evaluating the chemistry, manufacturing and controls (CMC) section of MSC product applications, with respect to raw materials, manufacture processes and quality control. We hope that the information summarized here will provide insights for the development and evaluation of MSC products.

收稿日期: 2019-02-23; 修回日期: 2019-04-22.

\*通讯作者 Tel: 86-10-85243072, E-mail: luojh@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0135

**Key words:** mesenchymal stem cell; clinical research; manufacture process; quality control; chemistry, manufacture and control evaluation

曾经认为, 间充质干细胞 (mesenchymal stem/stromal cell, MSC) 是来源于中胚层间充质的一类具有多向分化潜能的成体干细胞。目前研究较多的 MSC 主要来源于骨髓、脐血、脐带、外周血和脂肪组织, 不同组织来源的 MSC 在分子表型和分化潜能等各方面不尽相同。国际细胞治疗协会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 在 2005 年发布声明, 推荐将这种骨髓或其他组织来源的贴壁培养的细胞统称为间充质基质细胞, 其中具有干细胞特征的细胞可被称为间充质干细胞<sup>[1]</sup>。当前科学界对 MSC 并无明确定义, 由于不同 MSC 自我更新能力的差异, MSC 是否为干细胞也存在争议<sup>[2,3]</sup>。2006 年, ISCT 提出了判定 MSC 的最低标准和通用标志物<sup>[4]</sup>, 但科学界对此尚未达成共识。目前, 对 MSC 生物作用机制和临床作用的研究仍在探索中<sup>[5]</sup>。

## 1 间充质干细胞概述

随着发育生物学研究的进展, 人们对 MSC 的来源、不同组织中分布、表型和生理功能的认识在不断更新。1968 年 Friedenstein 等<sup>[6]</sup>发现鼠骨髓中的一群细胞可形成成纤维细胞样的克隆, 并且能通过体外诱导分化形成骨组织, 移植入小鼠皮下后可重建造血微环境。后期科学家发现骨髓中的这些细胞可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞。1991 年这种来自骨髓的细胞被命名为 MSC<sup>[7]</sup>。后来多种不同组织 (骨髓、肌肉、脂肪、胎盘、脐带、牙髓等) 的前体细胞均被统称为 MSC, 不同组织的发育过程不同, 这些前体细胞属于完全不同的细胞类型<sup>[8]</sup>。由于这些 MSC 易于分离扩增, 科学家对其开展了规模化培养和临床研究。但是, 不同来源的 MSC 克隆形态、分化潜能、自我更新能力和基因表达谱各异<sup>[9]</sup>, 这些差异也给 MSC 生产工艺的开发和质量标准的设置等研究带来了挑战。

## 2 间充质干细胞药物国内外研发进展

### 2.1 已批准上市的间充质干细胞药物

1995 年, MSC 首次作为细胞治疗产品用于人体试验<sup>[10]</sup>, 并快速成为临床研究数量最多的干细胞类型。近年来, 日本、韩国、加拿大、欧盟等国家和地区批准了数个 MSC 药物上市, 这些产品的组织来源包括骨髓、脂肪和脐带血等, 主要适应症包括心肌梗死、创伤性或退行性骨关节炎、克罗恩病、移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GvHD) 等。迄今为止, 中国和美国药监部门均未批准任何一种 MSC 药品上市。

### 2.2 临床研究阶段的间充质干细胞产品

截至 2018 年 12 月, Clinical trials 网站收录的 937 项 MSC 产品的临床试验中, 559 项为早期或 I 期临床试验, 53 项处于 III 期临床试验阶段。其中, 供者细胞的来源包括自体或异体来源, 脂肪来源的有 163 项、骨髓来源的有 284 项、脐带来源的有 137 项。处于 III 期临床试验阶段的 MSC 产品包括治疗脑卒中的 MultiStem、治疗肌萎缩侧索硬化的 NurOwn 和治疗心衰的 MPC-100-IM 等<sup>[11-13]</sup>。我国有多个 MSC 产品曾按照药品批准进入临床试验。近期, 正在或拟申报的 MSC 产品数量有增加趋势, 细胞的组织来源更加多样, 包括脂肪、脐带、胎盘和牙髓等, 功能主治包含移植物抗宿主疾病的治疗和预防、关节炎、慢性牙周炎等疾病的治疗。

不同来源的细胞产品侧重的适应症、人群和对应的给药方式有所不同。如异体骨髓来源的 Prochymal 产品用于治疗激素无效的 GvHD 临床 III 期试验 (NCT00366145), 结果表明, Prochymal 组与安慰剂对照组相比无显著性差异 ( $P = 0.12$ ), 但其在儿童人群中的响应率显著提高<sup>[5]</sup>。异体脂肪间充质干细胞用于克罗恩病肠瘘的临床 III 期试验 (NCT01541579) 结果显示, MSC 在克罗恩病相关的肛瘘治疗效果显著优于安慰剂<sup>[14]</sup>。该细胞临床给药时通过肛周皮下注射, 使得细胞易于局部定植发挥作用。自体骨髓来源的 MSC 产品 C3BS-CQR-1 用于治疗慢性缺血性心衰的临床 III 期试验 (NCT01768702) 中, 通过约 18 次 (每次 0.5 mL) 注射入心室不同位置。经过小于 20 次 MSC 注射的心衰患者在治疗 1 年后得到明显改善。由于多次注射可能会对本身完好的心肌造成损伤, 这种治疗方式的挑战在于临床注射技术和次数<sup>[15]</sup>。综合分析 MSC 产品的临床试验过程和结果, MSC 临床试验的效果与适应症、受试人群、治疗时机、观察时间和终点指标的选择密切相关, 需要结合不同适应症特点设计。

### 3 间充质干细胞的药学评价

由于 MSC 的定义尚存争议, 加上来源多样、功能与质量研究复杂, 其作用机制和临床效果的研究仍在探索中, 此类产品的药学评价也在不断认知加深过程中, 对于具体的产品也应结合不同细胞来源、生产工艺的特点等进行针对性的评价。笔者根据目前 MSC 产品的药学研究现状, 提出了现阶段药学审评的初步考虑。随着干细胞和再生医学技术的发展和科学界对 MSC 研究领域的进一步规范, 针对 MSC 产品的审评

理念也将不断更新。

### 3.1 生产用原材料

间充质干细胞的生产用原材料主要包括供者细胞/组织和细胞分离、培养所需的试剂等。其中供者细胞来源应符合伦理。商业化生产规模中1个供者的细胞可制备上千份细胞产品,供者细胞和组织的健康程度、分离培养、保存运输方式显著影响MSC细胞的功能<sup>[5,16]</sup>。迄今已报道从成人骨髓、羊水、羊膜、牙髓、牙周膜、滑膜液、子宫内膜、外周血、经血、唾液腺、皮肤、胎儿组织、胎盘和脐带等组织可分离培养得到MSC<sup>[17]</sup>。

MSC分离培养常用的试剂包括消化酶、培养基和生长因子等。审评常见MSC的培养使用胎牛血清,以保持细胞贴壁的生长状态和较高的存活率。不同供应商的牛血清来源和成分差异较大,且批与批间质量尚不能完全一致,牛血清的加入显著影响细胞的增殖和分化状态,也增加了细胞植入人体后发生免疫反应的可能。有研究比较牛血清和人自体血清培养的MSC发现,人自体血清培养的MSC体积较小、均一,自我更新速度快于牛血清培养的MSC<sup>[18]</sup>,且二者分化能力、基因表达谱和转录因子活性等均具有显著差异<sup>[19]</sup>。总之,建议细胞制备全过程避免加入血清,若必需使用,需按照药典要求控制血清质量,进行风险评估,并严格检测终产品中血清相关杂质的残留。监管方目前鼓励使用成分明确的血清替代物或无血清的培养工艺代替血清的使用。对于MSC产品的分离、扩增过程中常用的胶原酶、胰蛋白酶和抗生素等其他生产用原材料,选择时应考虑其使用的必要性和合理性,并进行安全性评估,高风险的原材料应进行残留量控制。选择生长因子、酶和激素等原材料时,建议尽量使用人工表达或合成的材料替代动物源性材料。

### 3.2 生产工艺

作为临床治疗用药的MSC,应在符合药品生产质量管理规范(Good Manufacturing Practices, GMP)的条件下制备。MSC生产工艺通常包括供者组织获取、细胞分离、细胞扩增培养和细胞冻存等步骤,应经过系统的工艺开发、验证过程,并形成规范操作流程。起始原材料、细胞分离富集、铺板密度、细胞传代次数、细胞培养添加物和培养环境等相关工艺参数均影响着MSC产品的质量。细胞分离工艺方面,骨髓、外周血和滑液来源的MSC通常使用Ficoll密度梯度离心方法分离,再经细胞贴壁培养纯化<sup>[18]</sup>。贴壁培养时一些血细胞在后续传代过程中逐渐洗掉,留下贴壁的成纤维样细胞。脐带、胎盘、牙髓和脂肪等组织来源的MSC通常使用胶原酶或胰蛋白酶消化分离,也可以通过非酶解的细胞爬片方法得到<sup>[20]</sup>。建议对细胞分离工艺进行深入研

究,包括消化酶使用浓度、作用时间和消化所得细胞质量等研究,应具有支持性数据说明采用的生产方法可保证产品的批间一致性<sup>[21,22]</sup>。

工艺参数方面,细胞铺板密度对其倍增时间、细胞形态和分化能力均有显著影响<sup>[23]</sup>。培养过程中,氧气浓度显著影响MSC扩增和CD146(cluster of differentiation 146)等分子标志物的表达<sup>[24]</sup>。在体外传代过程中,MSC多潜能性逐渐丢失,端粒的长度在缩短<sup>[25]</sup>,细胞形态也不断发生变化。体外培养过程中细胞的实际年龄通常由群体倍增时间表征。值得注意的是,长时间培养MSC可能存在细胞恶性转化的风险,研究表明,骨髓来源的MSC体外培养106周后,其形态、增殖速率、表型和分化能力均显著改变,抑癌基因p16和p21的启动子区域的甲基化程度升高,细胞在免疫缺陷鼠体内可形成肿瘤样组织<sup>[26]</sup>。近期有学者尝试通过重编程的方式延长MSC的体外存活时间和传代次数,但未能改善其体外扩增能力,且可能引起恶性转化的情况<sup>[27]</sup>。研究数据显示,体外传11代的小鼠MSC出现了染色体核型异常的情况,细胞注入小鼠体内可导致尾部、四肢和肺部的肿瘤<sup>[28]</sup>。因此,临床试验用级别MSC的制备,应关注细胞群体倍增代次,由于高代次的细胞出现转化的可能性较高<sup>[29]</sup>,建议尽可能缩短培养时间,将细胞倍增代次限制到低代次,并持续监测细胞倍增时间<sup>[21]</sup>。

此外,组织细胞分离、细胞扩增和细胞收获各阶段均应做好过程控制措施,包括必要的安全性指标的检测(如无菌、支原体、内毒素)和细胞活力等方面的监测。

MSC制剂处方和工艺应根据产品自身特点和临床使用方案进行系统研发,并进行工艺验证。目前MSC制品多采用细胞冻存制剂。应对冻存液中常见的电解质和人血白蛋白等辅料进行严格供应商审计,对辅料的使用浓度及其对细胞存活和分化能力的影响进行充分研究,尤其二甲基亚砜的用量应经过研究和安全性评估<sup>[30]</sup>。冻存降温速率对细胞的活性影响非常显著,通常情况下 $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 降温速度可较好保证MSC质量<sup>[31]</sup>。在解冻复苏后24 h内MSC呈现的分子表达谱显示细胞处于损伤状态,这个阶段的细胞容易被免疫细胞裂解,在血管内存活时间较短<sup>[32]</sup>。细胞解冻后几小时内即给患者输注,其活力、功能和体内存活时间均低于新鲜输注的细胞<sup>[5]</sup>,但基于临床使用细胞的储存需求,现阶段可以接受将解冻后的细胞用于临床试验。若将这种解冻后的MSC在体外恢复培养一段时间再输注,可提高细胞的活力,但同时增加了工艺步骤,也可能引入污染风险。

### 3.3 质量研究

MSC 质量研究从分子标志物和分化潜能、成瘤性、鉴别和效价、免疫调节活性、体内分布及归巢能力、纯度和杂质等几个方面论述。

**3.3.1 分子标志物和分化潜能** 根据 ISCT 发布的指南, 体外扩增的人 MSC 表达细胞表面标志物 CD73、CD105 和 CD90, 缺乏内皮细胞和造血干细胞标志物 CD34、CD31 和 CD45<sup>[4]</sup>。然而由于 MSC 可来源于多种组织, 对此目前存在争议, 如有研究认为特定阶段胚胎抗原-4 (stage-specific embryonic antigen-4, SSEA-4)、CD146 和基质前体抗原-1 (stromal precursor antigen-1, Stro-1) 也可以作为间充质干细胞的标志物<sup>[33,34]</sup>。各个组织来源的 MSC 分子标志物表达有所差异, 如有研究认为牙周膜源 MSC 的 CD90 表达量较其他分子多, 而脂肪源 MSC 的 CD105 表达量相对多。Stro-1 可表达于骨髓和牙髓来源的 MSC, 但不能表达在脂肪来源的 MSC 中<sup>[35]</sup>。通常来说, 脂肪来源的 MSC 细胞表达高水平的 CD49d、CD34 和 CD54 分子, 骨髓来源的 MSC 表达较高水平的 CD106, 同时表达 Stro-1、CD105、SSEA-4、CD73、CD49a 和 CD271 等分子, 而脐带来源的 MSC 不表达 CD271 分子<sup>[36]</sup>, 来自胎儿组织的 MSC 表达部分多能干细胞标志物包括 SSEA-3/4 和 Oct-4 (octamer-binding transcriptional factor-4) 等<sup>[37]</sup>。不同组织来源、不同形态的 MSC, 也具有显著不同的转录组表达谱和不同的体内分化潜能<sup>[38]</sup>, 见表 1。

综上, 笔者认为目前 ISCT 提出的标志物已不能充分表征不同组织来源的 MSC。因此, 建议根据细胞来源和培养方式, 尽量发掘和检测细胞的特异性标志物, 从而对细胞质量和分化能力进行分析, 综合评估细胞的生物学功能和临床应用潜力。

**3.3.2 成瘤性** 安全性评价方面, 成瘤性是细胞治疗

产品较大的风险之一<sup>[39]</sup>。前期发现的 MSC 成瘤性现象已经证明是由于细胞培养期间的肿瘤细胞系污染所致, 目前尚未有 MSC 临床应用于人体导致肿瘤的报道<sup>[39]</sup>。尽管非临床研究在啮齿类动物体内证实了 MSC 的成瘤性可能较低, 当前对于长时间存活于人体内的 MSC 的成瘤风险仍不明确。有研究表明, MSC 体外传 9 代时染色体核型正常, 但传代至 21 代后出现了核型异常的细胞, 且核型异常的细胞迅速增殖成为第 28 代细胞中的主要成分<sup>[40]</sup>。由于随着细胞代次的增加, 细胞成瘤性风险升高, 建议对供者细胞库、细胞制剂的成瘤性风险进行评估并严格质量控制。随着检测方法的不断开发, 现今可初步检测 MSC 发生恶性转化的方法包括核型分析、畸胎瘤形成试验、软琼脂克隆试验、基因组杂交、原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 等<sup>[41]</sup>。另外, 在动物实验中 MSC 非定向分化的情况较少见, 而在人体内的长期分化方向和潜能尚不明确。日本批准上市的 Temcell 输注患者后, 对患者进行了电子计算机断层扫描和 X-射线检测, 均未发现异位组织的形成, 并且监管方要求申请人长期监测, 观察患者体内是否形成异位组织 (<http://www.pmda.go.jp>)。

**3.3.3 鉴别和效价** MSC 的鉴别和效价测定是 MSC 作为药物申报时质量研究的重点, 反映其有效性, 并可衡量批间差异<sup>[42,43]</sup>。对于在限定传代范围内的 MSC 是间充质基质细胞还是干细胞目前仍有争议。形态上 MSC 和成纤维细胞较为类似, 均呈梭形贴壁生长。在特定培养条件下, MSC 中的单个干细胞通过自我更新形成克隆并可进一步体外分化形成含有不同类型细胞的组织<sup>[44,45]</sup>。MSC 体内活性目前没有通用的方法, 单一方法往往不足以表征细胞生物学活性, 需依据所关

**Table 1** The differentiation direction and biomarkers for mesenchymal stem cell (MSC) from different tissue sources<sup>[8,17]</sup>. The listed differentiation directions and markers may update with research progress. CD: Cluster of differentiation; STRO: Stromal precursor antigen; SSEA: Stage-specific embryonic antigen; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; HLA-DR: Human leukocyte antigen-DR isotype

Source	Differentiation direction	Positive marker	Negative marker
Bone marrow	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes, tendocytes	CD105, STRO-1, SSEA-4, CD73, CD49a, SSEA-4, CD271	CD14, CD34, CD45, HLA-DR
Dental pulp, periodontal ligament	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, neurons	CD29, CD44, CD90, CD105, GFAP	CD14, CD34, CD45
Synovium	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes	CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1	CD31, CD34, CD45, CD106
Adipose	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes	CD73, CD90, CD29, CD44, CD71, CD105, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD45
Skin and foreskin	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, vimentin	CD34, CD45, HLA-DR
Peripheral blood	Osteoblasts, adipocytes, fibroblast	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133
Placenta	Osteoblasts, chondrocytes	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Umbilical cord (Wharton's jelly)	Osteoblasts, chondrocytes, adipocytes	CD73, CD90, CD105, vimentin	CD14, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR

注的适应症进行开发。2013年ISCT对MSC免疫功能检测方法进行了规范,并建议行业内共享检测方法和标准,确保现有MSC产品活性检测方法的可靠性<sup>[46]</sup>。2015年,经ISCT会议讨论,科学界提出应组合不同方法(如核糖核酸定量分析、标志物流式检测、分泌蛋白分析和免疫细胞响应分析等)进行MSC细胞免疫功能的表征<sup>[43]</sup>,这也是MSC生物学效力测定的未来发展趋势<sup>[47]</sup>。

MSC和宿主免疫细胞间的相互作用可能是预测MSC体内效应的一个指标<sup>[48]</sup>。在GvHD患者中已经发现了受者的CD8<sup>+</sup>T细胞和CD56<sup>+</sup>自然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)可以分泌穿孔素和颗粒酶等,体外诱导MSC凋亡,该方法也可以预期MSC注射后患者的临床反应。至于这个方法是否能预测MSC的抗炎和组织修复功能,有待后续研究确定。多向分化能力也是MSC有效性的衡量指标。目前常用的染色方法有阿辛蓝染色鉴定软骨细胞、茜素红染色鉴定成骨细胞和油红染色鉴定脂肪细胞等,但上述方法往往需要较长时间(14~21天)的细胞培养,且难以区分死细胞,影响结果的判断。可根据临床适应症、细胞定植位置和功能需要等考虑在研发过程或批检测放行中选用上述方法。通常也可以用实时荧光定量PCR的方法检测分化功能标志基因的表达,然而不同供者细胞诱导培养后的基因表达谱也有较大差异。

此外, MSC的分泌因子含量是反映其旁分泌作用的常用指标。近期,科学家通过蛋白质组学分析了GMP条件下生产的MSC分泌物,其中包括参与免疫反应、氧化应激、细胞骨架形成和细胞代谢的多种蛋白,揭示了MSC分泌因子的潜在治疗作用<sup>[49]</sup>。另外, MSC培养过程产生的外泌体也有较强的临床应用潜力<sup>[50]</sup>,随着基础研究不断深入,分泌体(外泌体、凋亡小体)、线粒体转移分析均有希望成为MSC生物学功能衡量的新方法<sup>[51]</sup>。另外,不依赖于旁分泌作用机制来评价MSC效价的方法是测量细胞成纤维细胞样克隆(colony forming unit-fibroblast, CFU-F)形成能力,对

于该方法目前并没有一个标准化的操作流程,但克隆形成能力可反映细胞的干性,对于体内功能由细胞来发挥的MSC产品较为适用。

**3.3.4 免疫调节功能** MSC免疫调节功能的具体机制迄今仍不清楚,是否通过MSC-免疫细胞间相互作用实现其免疫抑制作用也未明确。MSC的免疫抑制作用与其细胞数量、与免疫细胞的距离、受体的激活和炎症细胞因子的分泌都有关系<sup>[52]</sup>。由于MSC仅表达少量主要组织相容复合物(major histocompatibility complex, MHC) I类分子,且不表达MHC II类分子及共刺激分子(如B7-1、B7-2、CD40、CD86等), MSC一般不产生强烈的免疫反应,可避开NK细胞的杀伤作用<sup>[53]</sup>。同时, MSC能通过细胞因子如白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )的分泌,抑制NK细胞和细胞毒T细胞的作用。MSC也可通过抑制B细胞和T细胞扩增,抑制单核细胞的成熟和树突状细胞分化,促进M0/M1型巨噬细胞向M2型极化,并且通过促进调节性T细胞的产生来抑制免疫反应。其免疫抑制作用受一系列细胞因子协同调控,而非单一的细胞因子,所以不同的培养方式和细胞因子的加入影响着MSC发挥免疫调控作用。ISCT建议使用IFN- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )孵育细胞进行MSC免疫调节能力的检测,并且使用纯化后的免疫细胞进行MSC免疫功能的分析<sup>[46]</sup>。近年来,也有学者提出MSC细胞并不具有免疫抑制作用<sup>[53]</sup>。因此, MSC产品的免疫调控功能需根据免疫学研究进展和产品质量研究的需要具体分析。

**3.3.5 纯度和杂质** MSC产品的杂质主要包括非目标细胞和原材料残留等,见表2。建议研发者尽可能开发区别活性细胞和杂质细胞的标志物,采用有效方法对成纤维细胞、血管外周细胞等非目标细胞和死细胞的残留量进行控制。原材料方面,建议使用验证后的方法,对高风险的原材料(如动物源性材料、抗生素)的残留量进行控制。

**Table 2** Quality control strategies for MSC-based products. FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; CFU-F: Colony forming unit-fibroblast

Quality control strategy	Specification
Donor screening	Negative for hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus 1/2, treponema pallidum etc. and communicable disease
Raw materials	Sterility, endotoxin, adventitious agents
Safety (cell bank, in-process control, lot release)	Sterility, mycoplasma, endotoxin, adventitious agents, tumorigenicity, soft agar colony formation assay, karyotype analysis, multicolor FISH, foreign insoluble matter
Cell viability	Cell viability, cell count/viable cell number
Identity	Cell morphology, short tandem repeat (STR) analysis, cell surface antigen
Potency	Multilineage differentiation capacity, immunomodulatory effects, cytokine secretion, CFU-F assay
Purity	Residual antibiotics, media components, trypsin, bovine serum albumin

#### 4 结语

近年来MSC相关研究取得了很大进展, 尽管人们对其作用机制的研究仍处于初期阶段, MSC对体内环境的适应性及其对多种疾病的潜在治疗能力依旧赋予其期盼的治疗优势。作用机制方面, 目前尚未研究清楚的问题包括: MSC移植后的存活、迁移和归巢机制; MSC与宿主免疫系统的相互作用; 体内增殖、分化和转分化潜力等。目前多数研究初步揭示了MSC对部分疾病的治疗作用, 但大部分均通过MSC自身细胞因子的分泌实现, 并非由细胞本身的作用导致。未来的MSC研究开始聚焦在特定来源MSC的分子标志物的发现, 以及MSC分化、转分化、归巢等行为的调控因子的发现上。MSC的临床给药方式、适应症和受试者的选择等显著影响MSC临床试验的结果, 前期MSC临床试验的成功和失败案例也为后续临床治疗方案的制定提供了重要参考依据<sup>[54]</sup>。生产工艺方面, 细胞分离工艺、培养条件和制剂工艺的开发有许多难点, 包括供者细胞个体化差异带来的不确定性、关键工艺参数的确定、如何保证产品批间一致性等。对于规模化培养工艺, 细胞制备过程细胞瘤变/癌变的风险也应进行研究确证。质量研究方面, 效价检测、死细胞/杂质残留量的检测等方法的开发具有较大挑战, 细胞分化能力测试需长时间进行细胞诱导培养, 检测周期长。此外, 流式细胞分析等方法的优化和相关方法学验证也是细胞质控所必需的。

目前各国药品评价机构均对干细胞产品的研发和临床应用高度关注。在我国, 随着2017年《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》等文件的出台和实施, 相关管理部门将逐步规范和细化细胞治疗产品的技术评价, 实现临床急需和创新型细胞产品的快速审评, 促进干细胞产业良性、健康和有序的发展。

#### References

- [1] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytherapy*, 2005, 7: 393-395.
- [2] Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 709-716.
- [3] Horwitz E, Keating A. Nonhematopoietic Mesenchymal Stem Cell Committee Report. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? [J]. *Cytherapy*, 2000, 2: 387-388.
- [4] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytherapy*, 2006, 8: 315-317.
- [5] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 824-833.
- [6] Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, et al. Heterotopic transplants of bone marrow [J]. *Transplantation*, 1968, 6: 230-247.
- [7] Caplan AI. Mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Res*, 1991, 9: 641-650.
- [8] Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources [J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2012, 2: 154-162.
- [9] Sacchetti B, Funari A, Remoli C, et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels [J]. *Stem Cell Rep*, 2016, 6: 897-913.
- [10] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use [J]. *Bone Marrow Transpl*, 1995, 16: 557-564.
- [11] Jossen V, Van Den Bos C, Eibl R, et al. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 3981-3994.
- [12] Lu JQ, Liu BN, Luo JH. Research progress and regulatory perspectives for stem cell-based regenerative medicine products [J]. *Sci Sin Vitae (中国科学: 生命科学)*, 2019, 49: 18-27.
- [13] Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, et al. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16: 360-368.
- [14] Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 388: 1281-1290.
- [15] Teerlink JR, Metra M, Filippatos GS, et al. Benefit of cardiopoietic mesenchymal stem cell therapy on left ventricular remodelling: results from the Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) study [J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19: 1520-1529.
- [16] Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 372: 51-65.
- [17] Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35: e0091.
- [18] Colter DC, Class RF, Digirolamo CM, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:

- 3213-3218.
- [19] Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, et al. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1357-1366.
- [20] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 2739-2749.
- [21] Wuchter P, Bieback K, Schrenzenmeier H, et al. Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17: 128-139.
- [22] Codinach M, Blanco M, Ortega I, et al. Design and validation of a consistent and reproducible manufacture process for the production of clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18: 1197-1208.
- [23] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 530-541.
- [24] Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with *in situ* localization [J]. *Blood*, 2011, 117: 5067-5077.
- [25] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro* [J]. *BMC Cell Biol*, 2006, 7: 14.
- [26] Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 5331-5339.
- [27] Göbel C, Goetzke R, Eggermann T, et al. Interrupted reprogramming into induced pluripotent stem cells does not rejuvenate human mesenchymal stromal cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 11676.
- [28] Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 371-379.
- [29] Barkholt L, Flory E, Jekerle V, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies-bridging scientific observations and regulatory viewpoints [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15: 753-759.
- [30] Mirabel C, Puente-Massaguer E, Del Mazo-Barbara A, et al. Stability enhancement of clinical grade multipotent mesenchymal stromal cell-based products [J]. *J Trans Med*, 2018, 16: 291.
- [31] Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, et al. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21: 1511-1524.
- [32] Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? [J]. *Stem Cells*, 2014, 32: 2430-2442.
- [33] Vaculik C, Schuster C, Bauer W, et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132: 563-574.
- [34] Zhang XH, Hirai M, Cantero S, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 1206-1218.
- [35] Park JC, Kim JM, Jung IH, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38: 721-731.
- [36] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 301-313.
- [37] Bieback K, Kinzebach S, Karagianni M. Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells Int*, 2011, 2010: 193519.
- [38] Lee WC, Shi H, Poon Z, et al. Multivariate biophysical markers predictive of mesenchymal stromal cell multipotency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E4409-E4418.
- [39] Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, et al. Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? [J]. *Stem Cells*, 2011, 29: 11-19.
- [40] Sensebé L, Tarte K, Galipeau J, et al. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 9-10.
- [41] Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation [J]. *Blood*, 2010, 115: 1549-1553.
- [42] Mendicino M, Bailey AM, Wonnacott K, et al. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 141-145.
- [43] Galipeau J, Krampera M, Barrett J, et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18: 151-159.
- [44] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466: 829-834.
- [45] Bianco P. "Mesenchymal" stem cells [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 677-704.
- [46] Krampera M, Galipeau J, Shi YF, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15: 1054-1061.
- [47] Chinnadurai R, Rajan D, Qayed M, et al. Potency analysis of mesenchymal stromal cells using a combinatorial assay matrix

- approach [J]. Cell Rep, 2018, 22: 2504-2517.
- [48] Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces *in vivo* recipient-mediated immunomodulation [J]. Sci Transl Med, 2017. DOI: 10.1126/scitranslmed.aam7828.
- [49] Bari E, Perteghella S, Di Silvestre D, et al. Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process [J]. Cells, 2018. DOI: 10.3390/cells7110190.
- [50] Codispoti B, Marrelli M, Paduano F, et al. NANometric BIO-Banked MSC-Derived Exosome (NANOBIOME) as a novel approach to regenerative medicine [J]. J Clin Med, 2018. DOI: 10.3390/jcm7100357.
- [51] Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency [J]. Cytotherapy, 2019, 21: 289-306.
- [52] DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells [J]. Front Immunol, 2012, 3: 182.
- [53] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32: 252-260.
- [54] Liang J, Zhang HY, Kong W, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9: 312.