·实验研究·

人间充质干细胞调控 Treg 细胞功能评价方法和质量标准的研究

韩晓燕,纳　涛,吴婷婷,袁宝珠
(中国食品药品检定研究院生物制品检定所细胞资源保藏研究中心,北京 100050)

[摘要]　**目的**:建立人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)调控调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)功能的标准评价方法和相关质量属性标准。**方法**:利用 hMSCs 与同种异体人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)共培养技术、流式细胞技术,和 hMSCs 生物学有效性质量属性研究用标准细胞株 CCRC-hMSC-S1(CCRC1),建立 hMSCs 调控 Treg 功能的标准评价技术,并对不同来源 hMSCs 调控 Treg 功能的质量属性标准进行研究。**结果**:确立不同来源 hMSCs 促进 Treg 增殖的初级质量属性标准值为(47.9±23.3)%;不同研发者、不同组织来源、不同代次的 hMSCs 在调控 Treg 功能方面存在一定差异;不同培养基条件对相关功能影响也较大。**结论**:通过建立标准化评价方法,在国际上首次提出了 hMSCs 调控 Treg 功能的初级质量属性标准,而基于标准评价方法和初级质量属性标准的标准化评价体系,可量化、客观地评价不同来源、不同工艺情况下 hMSCs 调控 Treg 的功能。

[关键词]　间充质干细胞;调节性 T 细胞;质量评价;评价方法;质量属性标准
[中图分类号]　R965.2　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)17－1605－11

Establishment of a cell function evaluation method and quality control standard for hMSCs regulating Treg

HAN Xiao-yan, NA Tao, WU Ting-ting, YUAN Bao-zhu
(*Cell Collection and Research Center, Institutes for Biological Products Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 100050, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To establish a standard quality assessment method and a quality attribute standard of human mesenchymal stem cells (hMSCs) regulating the regulatory T cells (Treg). **Methods**: Based on co-culturing of hMSCs with allogenic human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), flow cytometry, and a reference cell line CCRC-hMSC-S1 (CCRC1), a standard evaluation technique for hMSCs regulating Treg was established, which was further applied in quality attribute standard of hMSCs of various origins. **Results**: A percentage of (47.9 ± 23.3)% was established as the preliminary standard quality attribute value of hMSCs regulating Treg. The differences in manufacturing processes, cell growth media, cell passage numbers, and tissue origins significantly affected the quality of hMSCs regulating Treg. **Conclusion**: Through the development of the standardized evaluation technique, a preliminary quality attribute value of hMSCs regulating Treg function was established for the first time. The combination of the standardized assessment technique and the quality attribute value proved to be effective for quantitative evaluation of the quality of hMSCs and of great value in guiding the development of hMSCs products.

[**Key words**]　human mesenchymal stem cells (hMSCs); regulatory T cells (Treg); quality evaluation; assessment technique; quality attribute value

---

[基金项目]　国家重点研发计划资助项目(2016YFA0101501):临床级别干细胞标准化评估体系
[作者简介]　韩晓燕,女,博士,助理研究员,主要从事干细胞质量研究。联系电话:(010)53851710,E-mail:hanxiaoyan@ nifdc. org. cn。
[通讯作者]　袁宝珠,男,研究员,主要从事治疗性细胞产品质量研究。E-mail:yuanbaozhu@ nifdc. org. cn。

人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)是一类成纤维细胞样、具有一定自我更新和复制能力并且存在于所有成体组织的干细胞[1]。常见的 hMSCs 组织来源包括骨髓、脐带、脂肪、胎盘、羊膜或牙髓等。体外特定诱导分化条件下,hMSCs 可向骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等细胞系列分化。此外,hMSCs 还具有独特的免疫调控功能和促进组织再生的功能,并因此成为目前临床应用研究中发展最为迅速的干细胞类型[2-3]。

目前应用 hMSCs 所开展的临床研究包括针对骨及软骨疾病、移植物抗宿主病(graft versus host disease, GvHD)、多发性硬化症、急性脊髓损伤、系统性红斑狼疮、炎性肠炎、糖尿病、器官纤维化和心脑血管疾病等的治疗研究[4-5]。不断积累的研究证据表明,免疫调控功能是 hMSCs 治疗所有这些临床适应证最为重要的细胞生物学基础[6-8]。

hMSCs 主要是通过与不同类型的免疫细胞直接相互作用,和释放各种免疫调控活性分子或含有不同活性因子的细胞微泡(如外泌体),发挥其免疫调控功能[9-10]。在调控各类 T 细胞功能方面,hMSCs 可抑制 Th1 和 Th17 等促炎性 T 淋巴细胞亚群增殖活化,促进调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)增殖或极化[11-12]。

Treg 是一类具有免疫抑制功能的 CD_4^+ 细胞的 T 细胞亚群[13-14]。hMSCs 可促进 Treg 增殖/极化,并以此作为其治疗多种疾病的关键细胞生物学基础[15-17]。例如,在小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型和葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠炎性肠炎模型中,hMSCs 均可以通过促进 Treg 细胞的增殖/极化,抑制其他促炎性 T 细胞增殖及活性,进而调节各类免疫细胞亚群的比例、维持炎性微环境的免疫平衡[18-19]。因此,hMSCs 促进 Treg 增殖/极化是其免疫调控功能的重要组成部分,也是 hMSCs 生物学有效性中免疫调控功能方面的关键质量属性[20]。建立 hMSCs 对 Treg 调控功能的标准化评价方法和确立该质量属性的质量标准,对 hMSCs 的质量控制、产品研发及指导临床应用至关重要。

本研究首先利用前期工作所建立的 hMSCs 生物学有效性质量评价用标准细胞 CCRC-hMSC-S1(以下简称 CCRC1)[21],建立 hMSCs 调控 Treg 功能的标准化评价体系,在此基础上获得了 hMSCs 促进 Treg 增殖的初级质量标准值。最后,我们将本研究所建立的标准评价方法和初级质量标准值所构成的 hMSCs 调控 Treg 的标准化评价体系,应用于评价不同研发机构、不同制备工艺因素对 hMSCs 促进 Treg 增殖功能的影响,进而初步验证相关标准化评价体系的价值和实际意义。

材料与方法

1 试剂

RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,目录号:11875-093,批号:1638609);胎牛血清(美国 Hyclone 公司,目录号:SH30084.03,批号:GWH0092);植物血凝素(PHA,美国 Sigma 公司,目录号:L8902,批号:079M4064V);佛波酯(PMA,美国 Sigma 公司,目录号:P8139);离子霉素(ionomycin,美国 CST 公司,目录号:9995S),FITC 标记的抗人 CD4 抗体(美国 BD 公司,目录号:555346,批号:9073869);PE 标记的抗人 CD127 抗体(美国 BD 公司,目录号:557938,批号:9162697);APC 标记的抗人 CD25 抗体(美国 BD 公司,目录号:555434,批号:9056872);PE 标记的抗人 FoxP3 抗体(美国 BD 公司,目录号:560852,批号:8304977);人淋巴细胞分离液(天津灏洋公司,目录号:LTS1077);Transcription Factor Buffer Set 试剂盒(美国 BD 公司,目录号:562574,批号:9108792);CD_4^+ T 细胞分选用磁珠(德国美天旎公司,目录号:130-045-101,批号:5190812511);重组人 TGF-β_1(美国 PeproTech 公司,目录号:100-21,批号:0715209 A1416);IL-2(美国 PeproTech 公司,目录号:200-02,批号:111812-2 D2219)。

2 仪器

FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

3 细胞

本研究使用 65 株独立个体组织来源的 hMSCs,均为本中心保藏,并经过了本中心全面的 hMSCs 基本生物学属性鉴别和微生物学安全性检测。65 株 hMSCs 组织来源分别为:脐带 46 株、胎盘 4 株、牙髓 5 株、脂肪 5 株、骨髓 2 株、宫血 2 株、胰腺 1 株。本研究所使用独立健康供者的同种异体人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)共计 41 例,均由北京市红十字血液中心所提供的浓缩白细胞提取获得(北京市海淀区北三环中路 37 号)。

4 PBMCs 的制备

取人外周血浓缩白细胞 10 mL,用 PBS 稀释 1 倍。选取 1 支 50 mL 的离心管,将 20 mL 人淋巴细

胞分离液置于其中,再将 20 mL 稀释后的浓缩白细胞沿离心管壁轻轻加入到人淋巴细胞分离液上层,以 2 000 r·min^{-1}离心 20 min 后,将所形成的白色黏稠的单个核细胞层移入新离心管中。加入 40 mL PBS 混匀,再以 2 000 r·min^{-1}离心 10 min,并用 40 mL PBS 洗涤/离心 3 次。将细胞沉淀用 5 mL RPMI 1640 完全培养基重悬制成 PBMCs。用台盼蓝排除染色法计数活细胞数和活率,细胞活率需 >85%。

5 CD_4^+ T 细胞的分选

将 PBMCs 与 CD_4^+ T 细胞分选用磁珠按照一定比例进行共孵育,经过 1 次洗涤后过 MACS 分选柱,再经洗脱后使用,分选后 CD_4^+ T 细胞纯度可达 90%。具体操作可参考《美天旎磁珠分选说明书》。

6 hMSCs 调节 Treg 功能的测定与分析

将待检测的 hMSCs 复苏后培养至 90% 融合度,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,消化后用 RPMI 1640 完全培养基中和,然后离心,再用 RPMI 1640 完全培养基重悬,调整细胞密度至 1×10^6 个细胞·mL^{-1}。

6.1 hMSCs 与 PBMCs 共培养

选择 2×10^5 的 hMSCs 与 1×10^6 的 PBMCs 于 12 孔培养板中进行混合培养。实验设计分组为:① PBMCs 单独组。② PBMCs + hMSCs 组,每组设 3 个平行孔,补充 RPMI 1640 完全培养基至 1.0 mL·孔$^{-1}$。将细胞放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中共培养 5 d。

6.2 Treg 的检测

共培养结束后,将 12 孔培养板中各孔悬浮的 PBMCs 分别移入 1 个 1.5 mL 离心管中,2 000 r·min^{-1}室温离心 5 min,弃上清液,用 PBS 重悬。可采用两组流式荧光抗体组合对细胞进行标记染色:组合一,用 CD4,CD127 和 CD25 荧光抗体,室温孵育 30 min。组合二,先用 CD4 抗体和 CD25 抗体室温孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次,再用 Transcription Factor Buffer Set 试剂盒进行后续核转录因子 FoxP3(PE 标记)染色,具体操作可参见《试剂盒说明书》,然后用 PBS 洗涤 2 次,最终用 300 μL PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测,并使用 FCS Express V3 分析结果和作图。

6.3 数据分析与换算

通过以下公式计算 hMSCs 促进 Treg 增殖的百分率。

hMSCs 对 Treg 的增殖促进率 = (PBMCs 与 hMSCs 共培养组 − PBMCs 单独培养组)/(PBMCs 单独培养组)×100%

7 统计学分析

所有检测数据都以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行处理,两组数据比较采用 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示统计学上具有显著性差异。

结　果

1 方法学建立

1.1 确立 hMSCs 与 PBMCs 共培养作为 hMSCs 促进 Treg 增殖的基本分析方法

为建立 hMSCs 调控 Treg 的标准化分析技术,我们选择以细胞共培养法结合流式细胞分析法作为本研究的基本检测及分析方法。首先,我们设计了 2 种共培养体系,即 hMSCs + PBMCs 体系和 hMSCs + CD_4^+ T 细胞体系,在后一个共培养体系中需同时加入诱导因子 TGF-β_1 和 IL-2。2 种共培养体系所用的 PBMCs 和 CD_4^+ T 细胞为同一供者来源。利用流式细胞技术对 2 种培养体系中 hMSCs 促进 Treg 增殖的能力进行检测。其中,Treg 表型鉴别采用 $CD_{25}^+CD_{127}^-$(% CD_4^+)进行标记分析。

我们以 CCRC1 为 hMSCs 代表,作为基本检测及分析方法建立的研究对象。结果发现,在 2 种共培养体系中,CCRC1 对 Treg 的增殖均表现出显著的促进作用,并且促进率相似,不存在统计学差异($P>0.05$),见表 1。由于第 2 种共培养体系涉及细胞分选及细胞因子诱导等环节,操作步骤繁琐,因此在后续研究中,我们以 PBMCs 作为 Treg 的来源,并以 hMSCs 与 PBMCs 共培养作为整个研究工作的共培养方法。将异体来源的 PBMCs 与 CCRC1 共培养,或经磁珠分选所得的 CD_4^+ T 细胞与 CCRC1 共培养,CCRC1 与悬浮的免疫细胞数量比例均定为 1:5。共培养 5 d 后,通过流式细胞仪检测,分析培养体系中 Treg 细胞的比例,计算得出 Treg 增殖促进率。

表 1 比较 2 种共培养体系在检测 CCRC1 对 Treg 增殖促进效应的差异 %,$\bar{x}\pm s$,$n=3$

组别	$CD_{25}^+CD_{127}^-$ (% CD_4^+)	Treg 增殖促进率/%
PBMC	1.21 ± 0.12	
PBMC + CCRC1	1.98 ± 0.25	63.36 ± 21.01
CD_4^+ T cells + TGF-β_1 + IL-2	3.21 ± 0.06	
CD_4^+ T cells + TGF-β_1 + IL-2 + CCRC1	5.42 ± 0.47	68.85 ± 14.69

1.2 Treg 流式细胞鉴别及检测方法的确立

常用检测 Treg 的方法,是通过流式细胞术检测 $CD_4^+CD_{25}^+$,$CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$ 或 $CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$ 淋巴细胞亚群[22-25]。我们进一步从 3 种不同的细胞标记染色方法中,确立基本的 Treg 标记方法和流式细胞检测及分析方法。将 CCRC1 与 PBMCs 以 1∶5的比例共培养,共培养结束后对所收集的 PBMCs 分别进行 $CD_4^+CD_{25}^+$,$CD_{25}^+CD_{127}^-$(% CD_4^+)或 $CD_{25}^+FoxP_3^+$(% CD_4^+)这 3 种方式的 Treg 细胞标记染色。结果显示,3 种染色方法均显示 CCRC1 可显著促进 Treg 增殖,并且经这 3 种染色方法所检测的 Treg 增殖率数值相似,见表 2,相关差异不具有显著性(均 $P > 0.05$)。考虑到基于 $CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$ 表型的实验操作需要进行细胞破膜和核内转录因子染色,步骤较为繁琐,而基于 $CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$ 表型的标记方法,表型信息完整、操作简便,并与多数文献报道相符,所以我们选定该标记方法作为后续 Treg 的基本检测及分析方法。

表 2 3 种 Treg 标记方法及流式细胞分析结果的比较 % ,$\bar{x} \pm s$,$n = 3$

组别	$CD_4^+CD_{25}^+$(% Total T cells)	$CD_{25}^+CD_{127}^-$(% CD_4^+ T cells)	$CD_{25}^+FoxP_3^+$(% CD_4^+ T cells)
PBMC 单独培养组	1.91 ± 0.09	4.23 ± 0.15	3.05 ± 0.27
PBMC 与 CCRC1 共培养组	2.71 ± 0.21	6.11 ± 0.19	4.31 ± 0.09
Treg 增殖促进率/%	41.93 ± 5.36	44.68 ± 8.96	41.99 ± 12.42

1.3 hMSCs 与 PBMCs 共培养检测体系各参数的确定

在确定基本检测方法后,我们仍以 CCRC1 为代表对影响 hMSCs 促进 Treg 增殖的检测方法中各主要参数进行优化和确定,这些参数为 hMSCs 与 PBMCs 的数量比例、共培养时间、是否使用淋巴细胞激活剂和 PBMCs 的质量。

1.3.1 共培养体系中 hMSCs 与 PBMCs 数量比例的确定 考虑到不同 hMSCs 与 PBMCs 的比例会对 Treg 增殖效应产生不同的检测结果,为此我们设置了 CCRC1 与 PBMCs 从 1∶5到 1∶40 的比例分别进行共培养实验,然后检测共培养后 PBMCs 中 Treg 数量的变化。实验中,各组 PBMCs 的细胞数均为 1×10^6。结果发现,所有共培养细胞比例均可显示 CCRC1 对 Treg 的增殖促进效应,但只有 1∶5 ~ 1∶20 的比例区间可显示明确的量效关系,见表 3,并且 1∶5 的比例所产生的促进效应最强,所以后续研究中我们均采用 1∶5的 hMSCs 与 PBMCs 的混合比例。

表 3 不同 hMSCs∶PBMCs 比例对检测 hMSCs 调控 Treg 功能的影响 % ,$\bar{x} \pm s$,$n = 3$

组别	$CD_{25}^+CD_{127}^-$(% CD_4^+)	Treg 增殖促进率/%
PBMCs 单独培养组	2.01 ± 0.10	
CCRC1∶PBMCs = 1∶40	2.12 ± 0.24	5.47 ± 11.76
CCRC1∶PBMCs = 1∶20	2.12 ± 0.13	5.31 ± 6.49
CCRC1∶PBMCs = 1∶10	2.49 ± 0.05	24.05 ± 2.30
CCRC1∶PBMCs = 1∶5	3.09 ± 0.13	53.56 ± 6.42

1.3.2 共培养时间的确定 考虑到不同共培养时间会产生不同的检测结果,我们在同一检测实验中尝试了 1,3 和 5 d 的不同共培养时间,结果发现,CCRC1 对 Treg 的增殖促进作用具有明显的时间效应,并在 d 5 时达到最大效应,见表 4。因此后续研究中均以 5 d 作为 hMSCs 与 PBMCs 的共培养时间。

表 4 不同共培养时间对 hMSCs 促进 Treg 增殖功能的影响 % ,$\bar{x} \pm s$,$n = 3$

时间/d	组别	$CD_{25}^+CD_{127}^-$(% CD_4^+)	Treg 增殖促进率/%
1	PBMCs 单独培养组	5.42 ± 0.24	
	PBMCs 与 CCRC1 共培养组	5.80 ± 0.15	7.07 ± 2.78
3	PBMCs 单独培养组	5.81 ± 0.33	
	PBMCs 与 CCRC1 共培养组	7.00 ± 0.34	20.42 ± 5.78
5	PBMCs 单独培养组	6.56 ± 0.16	
	PBMCs 与 CCRC1 共培养组	9.46 ± 0.41	44.26 ± 6.24

1.3.3 淋巴细胞激活剂对 hMSCs 调控 Treg 功能检测结果的影响 在进行 hMSCs 调节免疫细胞功能检测中,常需加入不同的淋巴细胞增殖激活剂使 T 细胞处于激活增殖状态。在建立 hMSCs 调控 Treg 功能评价技术时,我们以广泛使用的 PHA 和 PMA + ionomycin 为淋巴细胞激活剂代表,研究其对 hMSCs

促进 Treg 增殖效应的影响。为此,我们设计了无激活剂组、PHA 处理组(终浓度 10 μg·mL^{-1})、PMA(终浓度 25 ng·mL^{-1}) + ionomycin(终浓度 1 μg·mL^{-1})处理组,实验 PHA 或 PMA + ionomycin 处理对 CCRC1 调控 Treg 功能的影响。如表 5 所示,无激活剂组中,CCRC1 可显著促进 Treg 的增殖;而 PHA 处理和 PMA + ionomycin 处理,均可显著促进 PBMCs 中 Treg 的比例,但与 CCRC1 共培养后,这 2 种激活方法所提升的 Treg 比例均被显著抑制,即 CCRC1 对 PHA 或 PMA + ionomycin 激活 Treg 的效应表现为抑制效应。因此,后续检测 hMSCs 调控 Treg 功能的研究中,我们只采用未激活的 PBMCs 与 hMSCs 这一共培养及检测体系。

表 5 淋巴细胞刺激剂对 hMSCs 调控 Treg 功能的影响 %,$\bar{x} \pm s$,$n = 3$

组别	$CD_{25}^{+}CD_{127}^{-}$(% CD_4^{+})	Treg 增殖促进率/%
PBMC 单独培养组	2.69 ± 0.19	
PBMC 与 CCRC1 共培养组	4.74 ± 0.35	76.33 ± 12.99
PBMC 单独培养组 + PHA	34.46 ± 2.70	
PBMC 与 CCRC1 共培养组 + PHA	18.93 ± 0.58	-(45.08 ± 1.68)
PBMC 单独培养组 + PMA + Ionomycin	15.54 ± 0.80	
PBMC 与 CCRC1 共培养组 + PMA + Ionomycin	6.69 ± 0.74	-(56.95 ± 4.73)

1.3.4 PBMCs 中 Treg 的数量及比值对检测结果的影响 在整个检测体系中,影响检测结果客观性的 PBMCs 质量问题,应是 Treg 在 PBMCs 中所占比例的问题,Treg 的比例过高或过低均可影响检测结果的客观性。为此,我们分析了 41 个不同供者来源 PBMCs(标记为 P001 ~ P041)中 Treg 所占的比例。结果发现,不同供者来源的 PBMCs 中,Treg 所占比例差异较大,其 $\bar{x} \pm s$ 为(3.73 ± 1.40)%。在所有检测的 PBMCs 中,Treg 百分比低于 2% 的有 4 例,介于 2% ~ 6% 的有 33 例,>6% 的有 4 例。

根据文献报道健康供者 PBMCs 中 Treg 的比例可在 3.22% ~ 4.43%[26],因此,我们将 Treg 比例 < 2% 或 > 6% 的数据剔除,保留 Treg 比例介于 2% ~ 6% 之间的 PBMCs(共 33 例)用于本研究。这 33 个不同供者 PBMCs 中 Treg 百分比 $\bar{x} \pm s$ 为(3.63 ± 0.94)%。

2 确定标准对照细胞 CCRC1 的 Treg 增殖促进率初级标准值

将 P10 ~ P20 间的 CCRC1 分别与以上 33 例 PBMCs进行共培养,检测并计算各独立实验中 CCRC1 对 Treg 增殖的促进率,见表 6,结果发现,各独立检测结果差异较大,平均值为(46.88 ± 18.01)%。

表 6 CCRC1 对 33 个独立供者 PBMCs 中 Treg 的增殖促进率 %

PBMC 编号	PBMCs 自身 Treg	CCRC1 代次	Treg 增殖促进率
P001	4.00	P16	33.8
P004	3.54	P16	29.6
P005	2.57	P12	41.6
P007	2.93	P14	20.5
P008	3.95	P14	50.5
P009	3.64	P13	62.2
P010	2.05	P14	35.8
P011	3.43	P13	46.3
P012	2.76	P14	24.7
P013	2.61	P14	72.9
P016	3.93	P15	36.9
P017	3.15	P18	21.9
P018	5.32	P14	48.1
P019	5.60	P16	54.2
P020	3.59	P14	27.0
P021	3.79	P20	39.0
P023	3.17	P15	80.8
P024	3.04	P15	66.8
P025	2.70	P14	18.2
P026	4.16	P12	46.9
P029	4.63	P16	43.0
P030	5.79	P17	15.5
P031	5.37	P11	81.8
P032	4.49	P14	54.8
P033	3.24	P15	80.2
P034	3.50	P12	51.6
P035	2.91	P13	57.4
P036	4.24	P18	46.0
P037	3.96	P17	35.1
P038	3.38	P20	50.8
P039	3.23	P16	56.9
P040	2.16	P11	58.3
P041	3.03	P13	58.1

我们同时发现,在 10 ~ 20 代之间的 CCRC1 的 Treg 增殖促进率无显著差异,见表 7,说明在有限代次内,CCRC1 具有较稳定的促进 Treg 增殖的能力。因此,我们将 CCRC1 与 33 个不同供者来源的 PBMCs 进行独立共培养所获得的检测结果的平均值(46.88%),作为 CCRC1 对 Treg 增殖促进率的初级标准值,并将其应用于后续 hMSCs 对 Treg 增殖促进质量标准的研究。将表 6 的 Treg 增殖促进率数据按照 CCRC1 代次分为 2 组(组 1:10 ~ 14 代;组 2:15 ~ 20 代),并进行统计学分析,采用 t 检验比较两组差异。

表 7 不同代次 CCRC1 对 33 个独立供者 PBMCs 中 Treg 的增殖促进率

CCRC1 代次	例数 (n)	Treg 增殖促进率 /% ($\bar{x} \pm s$)	P 值
组 1:10 ~ 14 代	18	47.6 ± 17.4	0.81
组 2:15 ~ 20 代	15	46.0 ± 19.3	

3 hMSCs 促进 Treg 增殖的质量属性初级标准值的确定

在以上工作的基础上,为确定 hMSCs 促进 Treg 增殖功能质量属性的标准值,我们共选择了 46 个不同供者来源的 hMSCs(含不同组织来源,均为 P5 代次,编号为 M001 ~ M046),分别与各独立 PBMCs 共培养,在各独立 hMSCs 实验设计中均同时设置 CCRC1 作为参比细胞,并分别对各独立的 hMSCs 和 CCRC1 实验所对应的 Treg 值进行检测,分别计算其对 Treg 的初始增殖促进率,结果见表 8。我们用各独立实验所获得的 CCRC1 初始促进率和上述所得的 CCRC1 的初级标准值,按如下计算公式,对各独立 hMSCs 的初始增殖促进率进行标准化校正,获得校正后的各 hMSCs 的 Treg 增殖促进率。

$$\text{校正后的 hMSCs 对 Treg 增殖促进率} = \frac{\text{hMSCs 初始 Treg 增殖促进率}}{\text{CCRC1 初始 Treg 增殖促进率}} \times \text{Treg 增殖促进率标准值}_{\text{标准对照细胞}}$$

表 8 不同供者来源 hMSCs 对 Treg 增殖的初始促进率和校准后促进率 %

供者编号	PBMCs 自身 Treg	受测细胞(初始)	CCRC1(初始)	受测细胞校正后	供者编号	PBMC 自身 Treg	受测细胞(初始)	CCRC1(初始)	受测细胞校正后
M001	4.00	27.0	34.0	37.2	M024	3.04	88.2	66.8	61.9
M002	2.57	22.8	41.6	25.7	M025	3.04	57.9	46.9	57.9
M003	6.90	53.0	56.7	43.8	M026	4.16	48.6	51.7	44.1
M004	2.07	67.6	29.6	107.1	M027	3.51	64.7	95.5	31.8
M005	2.07	63.8	29.6	101.0	M028	2.33	28.6	40	66.6
M006	6.89	59.3	57.1	48.7	M029	2.33	86.9	57.3	71.1
M007	3.95	29.6	50.5	27.5	M030	2.91	76.3	57.3	62.4
M008	3.64	63.2	62.2	47.6	M031	4.68	14.7	42.3	16.3
M009	1.93	57.0	45.6	58.6	M032	2.82	14.2	39.9	16.6
M010	1.93	87.6	45.6	90.1	M033	3.59	38.7	23.2	78.2
M011	1.93	52.8	45.6	54.3	M034	4.65	11.8	33.4	16.6
M012	2.64	65.9	65.9	46.9	M035	4.65	17.2	33.4	24.2
M013	2.64	65.2	65.9	46.4	M036	4.65	9.4	33.4	13.2
M014	3.93	36.6	36.9	46.5	M037	4.75	42.0	79.0	24.9
M015	3.93	39.1	36.9	49.7	M038	2.45	46.3	86.9	24.9
M016	3.93	48.3	21.9	103.4	M039	2.01	48.0	59.3	38.0
M017	3.15	39.5	48.1	38.5	M040	2.01	61.6	59.3	48.7
M018	5.32	43.2	48.1	42.1	M041	2.19	128.2	77.1	77.9
M019	5.32	43.6	48.1	42.5	M042	3.26	79.2	47.0	79.0
M020	5.32	75.8	81.0	43.9	M043	3.05	48.1	60.1	37.5
M021	6.37	58.0	80.8	33.7	M044	3.59	21.0	23.2	42.4
M022	3.17	47.6	80.8	27.6	M045	3.03	29.8	64.8	21.5
M023	3.17	65.1	66.8	45.7	M046	3.68	37.7	45.1	39.2

将表 8 中 46 个不同供者来源 hMSCs 对 Treg 增殖的促进率(校准后)进行统计分析,得到平均值为 47.9%,标准差为 23.3%。这样,在前述所确立的标准评价方法和 CCRC1 参比细胞的基础上,我们可以提出 hMSCs 对 Treg 增殖促进的质量属性初级标准值应为(47.9 ±23.3)%。

4 标准评价方法和初级质量标准值在 hMSCs 生物学有效性质量研究中的应用

由上述标准评价方法和相关质量属性初级标准值构成 hMSCs 调控 Treg 质量属性的标准评价体系。该评价体系应具有对未知 hMSCs 相关质量属性的评价功能和对影响相关质量属性的工艺质量研究具有实际指导意义。以下为标准评价体系在 MSCs 细胞制品及其工艺质量评价中的应用研究,以验证标准评价体系的应用价值。

4.1 对未知 hMSCs 调控 Treg 功能的质量评价

本部分中,我们对 10 个未经质量评价的不同个体来源的 hMSCs(X001 ~ X010,均为 P5 代次细胞)以及 10 个不同个体来源的脐带 hMSCs(Q001 ~ Q010,均为同一代次)分别进行了促 Treg 增殖能力的评价,经检测、分析和数据标准化处理后,得到各自 hMSCs 的 Treg 增殖促进率,见表 9。从结果可以看出,不同供者不同组织 hMSCs 的 Treg 促进率相差很大;不同个体脐带 hMSCs 在对 Treg 的免疫调控功能上也存在较大差异,说明个体差异直接影响了 hMSCs 调控 Treg 功能。

表 9 应用标准化评价体系对待测 hMSCs 调控 Treg 功能的质量评价 %

待测细胞	来源	PBMC 自身 Treg	待测细胞 Treg 促进率(初始)	CCRC1Treg 促进率(初始)	待测细胞 Treg 促进率(校正后)
X001	脐带	3.96	94.3	35.1	125.9
X002	脂肪	2.91	63.8	57.3	52.2
X003	脐带	3.38	83.9	110.3	35.7
X004	脐带	4.24	13.7	46.1	13.9
X005	脂肪	3.03	32.8	58.0	26.5
X006	脐带	2.91	51.9	57.3	42.5
X007	宫血	4.63	51.0	43.0	55.6
X008	胎盘	5.37	74.9	81.8	42.9
X009	脐带	2.70	58.2	18.2	149.9
X010	胰腺	5.60	49.5	54.2	42.8
Q001	脐带	6.90	54.3	56.7	44.9
Q002	脐带	3.95	46.4	50.5	43.1
Q003	脐带	3.93	42.3	36.9	53.7
Q004	脐带	5.32	34.4	48.1	33.5
Q005	脐带	4.16	54.3	46.9	54.3
Q006	脐带	2.33	39.8	95.5	19.5
Q007	脐带	3.51	35.9	51.7	32.6
Q008	脐带	2.91	43.1	57.3	35.3
Q009	脐带	3.38	42.5	110.3	18.1
Q010	脐带	3.96	66.0	35.1	88.2

4.2 不同研发者制备的 hMSCs 促进 Treg 增殖功能的差异分析

不同研发者所代表的不同制备工艺和相同制备工艺所制备的相同细胞不同代次间的差异可能会表现在调控 Treg 上的差异。本部分中,我们选择了 5 家研发者(Y001,Y002,Y012,Y013,Y014)各自生产的一个批次不同代次的 hMSCs,对这些细胞调控 Treg 的功能进行评价,见表 10。结果显示,不同研发者所制备的 hMSCs 在调控 Treg 功能上存在很大差异,在 P10 代次以前,随着代次的增加,hMSCs 对 Treg 的增殖促进率呈上升趋势;但在 P10 代次以后则趋于平稳,Treg 促进率没有明显改变。此外,选择 3 家研发者(Y001,Y011,Y012)各自生产的 3 批脐带来源的 hMSCs(B1,B2,B3),均选择 P5 代次,对各

研发者制备的细胞调控 Treg 功能的批间差异进行评价,见表 10。结果表明,3 家研发者制备的不同批次脐带 hMSCs 的 Treg 调控功能批间差异都很小。但从待测细胞的初始 Treg 促进率数据来看,各研发者(尤其是 Y012)的不同批次细胞批间差异明显大于校准后数据。

表 10 不同代次、不同批次 hMSCs 对 Treg 增殖促进率差异分析 %

研发者	代次/批次	PBMC 自身 Treg	待测细胞 Treg 促进率(初始)	CCRC1 Treg 促进率(初始)	待测细胞 Treg 促进率(校准后)
Y001	P5	6.90	52.8	45.6	54.3
	P10	6.90	80.8	45.6	83.1
	P15	6.90	79.3	45.6	81.5
Y002	P5	3.95	29.6	50.5	27.5
	P10	3.95	46.4	50.5	43.1
	P15	3.95	48.8	50.5	45.3
Y012	P5	2.57	59.3	57.1	48.7
	P10	2.57	77.3	57.1	63.5
	P15	2.57	78.3	57.1	64.3
Y013	P3	5.32	58.7	81.0	34.0
	P7	5.32	75.8	81.0	43.9
	P15	5.32	90.3	81.0	52.3
	P30	5.32	97.6	81.0	56.5
Y014	P1	1.93	75.6	45.6	77.7
	P4	1.93	87.6	45.6	90.1
	P10	1.93	106.2	45.6	109.2
Y001	B1	6.90	54.3	56.7	44.9
	B2	2.93	45.3	48.1	44.2
	B3	4.23	75.2	70.8	49.8
Y011	B1	5.14	43.5	40.6	50.2
	B2	2.64	65.9	65.9	46.9
	B3	2.64	65.2	65.9	46.4
Y012	B1	2.57	59.3	57.1	48.7
	B2	1.93	57.0	45.6	58.6
	B3	2.18	300.8	330.5	42.7

4.3 不同培养条件对 hMSCs 调控 Treg 功能的影响

hMSCs 培养条件包括添加牛血清的完全培养基、含血小板裂解物的无血清培养基、不含血小板裂解物的化学成分明确的无血清培养基(含不同成分的生长因子)这三大类。表 11 列举了使用这 3 种不同培养基培养的 5 个不同供者来源的 hMSCs(均为 P10 代次)对 Treg 的增殖促进率。结果显示,对于同一株 hMSCs,经含牛血清完全培养基和含血小板裂解物的无血清培养基培养后,细胞对 Treg 的增殖促进率没有显著差异;经化学成分明确的无血清培养基培养后,对 Treg 的增殖促进率明显低于前 2 种培养基。

表 11 不同培养条件对 hMSCs 调控 Treg 功能的影响 %

hMSCs 供者编号	培养基	PBMC 自身 Treg	待测细胞 Treg 促进率(初始)	CCRC1 Treg 促进率(初始)	待测细胞 Treg 促进率(校准后)
MSC017	A	4.90	39.52	53.61	34.56
	B	4.90	43.33	53.61	37.89
	C	4.90	19.32	53.61	16.89

续表 11

hMSCs 供者编号	培养基	PBMC 自身 Treg	待测细胞 Treg 促进率(初始)	CCRC1 Treg 促进率(初始)	待测细胞 Treg 促进率(校准后)
MSC031	A	4.90	42.93	53.61	37.54
	B	4.90	45.37	53.61	39.68
	C	4.90	2.86	53.61	2.50
MSC036	A	4.90	29.66	53.61	25.94
	B	4.90	38.91	53.61	34.03
	C	4.90	1.84	53.61	1.61
MSC043	A	4.90	35.99	53.61	31.47
	B	4.90	34.90	53.61	30.52
	C	4.90	24.29	53.61	21.24
MSC046	A	4.90	37.21	53.61	32.54
	B	4.90	37.69	53.61	32.96
	C	4.90	25.71	53.61	22.49

A:含胎牛血清完全培养基; B:含血小板裂解物的无血清培养基; C:不含血小板裂解物的成分明确的无血清培养基

讨　论

2015 年颁布的《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》中,将 hMSCs 对免疫细胞调节能力的检测作为不同组织来源 hMSCs 生物学有效性评价的检测内容[27]。而 hMSCs 对 Treg 的调节功能是其免疫调控功能的重要体现。因此,hMSCs 调控 Treg 功能检测的方法学研究、相应评价方法和评价标准的建立,对 hMSCs 制品生物学有效性评价和临床效应的预测都有非常重要的意义。本研究对 hMSCs 调控 Treg 这一质量属性进行了方法学研究,并最终建立了可用于评价 hMSCs 制品调控 Treg 功能的标准化评价方法和这一质量属性的初级标准。我们所建立的评价方法和初级质量标准,可有效地减少 hMSCs 产品质量评价时因不同供者来源的 PBMCs 间质量差异所引起的误差,从而能更准确客观地反映不同 hMSCs 制品调控 Treg 的功能。

目前国内外已有大量的文献报道体外评价 hMSCs 调控 Treg 功能的方法,然而不同文献所采用的评价方法存在显著差异,这其中包括 Treg 表面标志鉴定方法的选择和共培养检测体系的选择等。本研究中,我们通过以下 4 个方面对这一评价方法进行了方法学研究和优化:① Treg 的表面标志鉴别方法的选择。② hMSCs 与 TGF-β + IL-2 诱导的 CD_4^+ T 和 hMSCs 与 PBMCs 这 2 种共培养检测体系的比较研究。③ hMSCs 与 PBMCs 共培养中两者数量比例的确定。④ hMSCs 与 PBMCs 共培养时间的确定。

我们从文献中选择并比较了 $CD_4^+CD_{25}^+$, $CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$, $CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$ 这 3 种鉴别方法,结果表明,这 3 种方法在最终的 Treg 增殖率结果判定时,不存在统计学差异,因此确定了 $CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$ 这一操作简便的 Treg 鉴别方法。通过 hMSCs 与 TGFβ + IL-2 诱导的 CD_4^+ T 细胞共培养和 hMSCs 与 PBMCs 共培养体系的比较研究,我们发现,2 种共培养体系可获得相似的 hMSCs 对 Treg 增殖促进率数值,因此确定了 hMSCs 与 PBMCs 共培养这一操作简便的共培养检测体系。在 hMSCs: PBMCs 数量比例和共培养时间方面,我们确定了共培养时间为 5 d,hMSCs: PBMC 的数量比例为1: 5。通过上述方法学研究和实验条件优化,我们建立了 hMSCs 调控 Treg 的标准检测方法。

标准检测方法所使用的 PBMCs 的质量是影响该方法在评价 hMSCs 调控 Treg 功能的关键因素。不同供者来源的 PBMCs 所含各类免疫细胞的比例、基础细胞因子分泌量等都存在很大差异,并都可影响 Treg 亚群的分化和增殖,从而影响 PBMCs 中 Treg 所占比例,和 PBMCs 与 hMSCs 共培养后 Treg 增殖率的准确性。此外,不同供者 PBMCs 自身潜在微生物污染,PBMCs 的采集、分离、保存、运输以及实验时可能使用的冻存 PBMCs,在冻存时间、冻存后复苏等因素都会存在巨大差异,所有这些因素又都会直接影响 PBMCs 的质量以及 Treg 在 PBMCs 中所占比例及增殖活性。因此,我们首先依据以往研究报道的健康人外周血新鲜分离的 PBMCs 中正常 Treg

比例数值(即 2% ~6%),对不同供者来源 PBMCs 进行筛选,将筛选后的 PBMCs 用于研究中。

为了减少不同供者来源 PBMCs 综合质量差异这一因素的影响,我们将前期所建立的 CCRC1 作为实验中的标准对照细胞,通过将 CCRC1 与 33 个不同供者来源 PBMCs 共培养,分别计算其对不同供者 Treg 增殖的促进率,将其平均值作为 CCRC1 细胞促进 Treg 增殖的初级标准值。CCRC1 标准细胞的设置和相应的初级标准值的确定,对后续获得 hMSCs 调控 Treg 功能的初级标准值以及对未知待检 hMSCs 的质量评价和 hMSCs 制备工艺的评价均具有重要意义。

为了进一步建立 hMSCs 调控 Treg 功能的初级质量标准,我们将符合已知基本质量属性的 46 株不同供者来源的 hMSCs,与经筛选的 PBMCs 进行共培养,首先获得各自 hMSCs 促进 Treg 增殖的初步数据。在对每一株 hMSCs 进行检测时,我们均平行设置了参比细胞 CCRC1 的检测,并在结果分析时,依据标准对照细胞的检测值和标准细胞的初级标准值,对各独立 hMSCs 株检测数据进行标准化校正,最后计算出 46 株 hMSCs 调控 Treg 的均化增殖促进率,并以这一校正后的均化数据作为 hMSCs 调控 Treg 功能质量属性的初级质量标准值。

然而,需要强调的是,本研究所确立的标准细胞 CCRC1 调控 Treg 功能的质量标准值和更具普遍意义的 hMSCs 调控 Treg 的标准值仍具有初级标准值的性质,未来在不断积累相关数据的过程中,这些标准值都将会趋向更客观性和准确性。此外,可利用 hMSCs 调控 Treg 功能初级标准值的变异度设置质量符合度区间。例如,目前相关质量符合度区间可设为(47.9 ± 23.3)%,作为判定未知 hMSCs 调控 Treg 的质量标准。然而,质量符合度区间的设置仍需要未来新的验证实验支持。

基于上述检测方法的确立及优化、标准对照细胞的设置及标准细胞初级标准值的确定、hMSCs 调控 Treg 质量属性初级标准值的确定,我们建立了 hMSCs 调控 Treg 功能的标准化评价体系。经过对这一标准化评价体系的验证和应用,我们发现该标准化评价体系不仅能够客观准确地评价不同研发者来源、不同个体来源、不同组织来源、不同传代次数的 hMSCs 在调控 Treg 增殖方面的差异性,还可用于评价不同制备工艺(以不同培养体系为主)在 hMSCs 调控 Treg 功能上的差异性。研究结果显示,同一研发者生产的不同批次 hMSCs 的 Treg 调控功能差异较小;含胎牛血清的培养体系和含血小板裂解物培养体系对 hMSCs 调控 Treg 功能的影响,明显小于成分明确的无血清培养体系,这可能与后者的添加成分有直接关系。一般情况下,商业配制的培养基中所含细胞因子和营养因子成分及含量都是难以获知的,其对后续进行 MSCs 免疫调控功能测定的影响也是无法预计的。因此,在实际进行 hMSCs 的 Treg 调控功能评价工作中,我们往往会在待检 hMSCs 贴壁后,除去 hMSCs 培养基,再使用含血清的淋巴细胞培养基对待检 hMSCs 培养 1 ~2 d 后,再加入 PBMCs 进行共培养和后续检测。这一操作也使得培养基中的添加成分对实验结果的影响大大降低。

我们所建立的 hMSCs 调控 Treg 功能的标准化评价体系仍存在一些不足,检测方法的方法学验证仍需大量研究工作和数据支持,hMSCs 调控 Treg 质量属性初级标准值仅是在少量数据基础上获得的,未来需要在更多研究数据积累后形成更为客观准确的标准值。总之,本研究工作是在以往建立 hMSCs 生物学有效性质量属性评价用标准细胞 CCRC1 工作的基础上,在 hMSCs 免疫调控质量标准研究及标准制定方面的又一成果,具有评价方法的客观性、准确性和实用性。新的质量属性标准是继本课题组所完成的另一个相关质量属性标准[28]后的又一重要尝试和又一新的成果,目前尚未见同类研究成果报道。这一成果虽仍具有初级标准值的性质,但已可用于指导目前的 hMSCs 制品在相关质量属性方面的工艺研发和质量评价,并可与其他 hMSCs 标准化质量评价内容一起共同指导现阶段 hMSCs 制品的监管。

[参 考 文 献]

[1] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726 -736.

[2] 韩晓燕, 纳涛, 张可华, 等. 人间充质干细胞生物学有效性的质量评价[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(21): 2511 -2518.

[3] KIMBREL EA, LANZA R. Next-generation stem cells-ushering in a new era of cell-based therapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7): 463 -479.

[4] GALIPEAU J, SENSÉBÉ L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 824 -833.

[5] PAREKKADAN B, MILWID JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010, 12(1): 87 -117.

[6] 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(2): 151 – 159.
[7] 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(9): 1054 – 1061.
[8] NAJI A, EITOKU M, FAVIER B, *et al*. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17): 3323 – 3348.
[9] GEBLER A, ZABEL O, SELIGER B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(2): 128 – 134.
[10] BERNARDO ME, FIBBE WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4): 392 – 402.
[11] 张可华, 纳涛, 韩晓燕, 等. 基于免疫调控功能的间充质干细胞生物学有效性质量评价策略[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(3): 283 – 290, 296.
[12] SINGER NG, CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011, 6(1): 457 – 478.
[13] BENOIST C, MATHIS D. Treg cells, life history, and diversity [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a007021.
[14] SHEVACH EM. Mechanisms of $FoxP_3^+$ T regulatory cell-mediated suppression[J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 636 – 645.
[15] NEGI N, GRIFFIN MD. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: current understanding and clinical relevance [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(5): 596 – 605.
[16] WANG D, HUANG S, YUAN X, *et al*. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Mol Immunol*,2017,14(5):423 – 431.
[17] LIU Y, LI C, WANG S, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells confer potent immunosuppressive effects in Sjögren's syndrome by inducing regulatory T cells [J]. *Mod Rheumatol*, 2021, 31(1): 186 – 196.
[18] LUZ-CRAWFORD P, KURTE M, BRAVO-ALEGRÍA J, *et al*. Mesenchymal stem cells generate a CD_4^+ CD_{127}^+ $FoxP_3^+$ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3): 65.
[19] HEIDARI M, POUYA S, BAGHAEI K, *et al*. The immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-conditioned medium in chronic colitis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8754 – 8766.
[20] YUAN BZ. Establishing a quality control system for stem cell-based medicinal products in China[J]. *Tissue Eng A*, 2015, 21(23 – 24): 2783 – 2790.
[21] 张可华, 纳涛, 韩晓燕, 等. 人间充质干细胞生物学有效性质量评价用标准细胞株 CCRC-hMSC-S1 的建立及评价[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(21): 2502 – 2510.
[22] YU N, LI X, SONG W, *et al*. CD_4^+ CD_{25}^+ CD127 (low/ –) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood [J]. *Inflammation*, 2012, 35(6): 1773 – 1780.
[23] LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, *et al*. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD_4^+ T reg cells[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1701 – 1711.
[24] QIU J, CHE G, LIU F, *et al*. The detection and clinical significance of peripheral regulatory CD_4^+ CD25hiCD127low T cells in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(10): 1343 – 1347.
[25] ZHU Y, HUANG Y, MING B, *et al*. Regulatory T-cell levels in systemic lupus erythematosus patients: a meta-analysis[J]. *Lupus*, 2019, 28(4): 445 – 454.
[26] HUANG ZX, ZHENG BR, LI TW, *et al*. Study on expressions of CD25 and CD127 in CD_4^+ peripheral T lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(35): 2476 – 2480.
[27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. (2015 – 08 – 21). http://www.moh.gov.cn/qjjys/s3581/201508/15d0dcf66b734f338c31f67477136cef.shtml.
[28] 吴婷婷, 韩晓燕, 李欣, 等. 人间充质干细胞抑制同种异体人外周血 Th17 淋巴细胞增殖活性的质量标准体系的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(2): 192 – 201.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 05 – 24