

围产期成体干细胞

WEICHANQI CHENGTI GANXIBAO

基础与临床应用

JICHU YU LINCHUANG YINGYONG

侯宗柳 孟明耀 王文举 主编

云南出版集团公司
云南科技出版社
· 昆 明 ·

编委会名单

主 编：侯宗柳 孟明耀 王文举

副主编：金醒昉 吕昭萍 王晋文 毛希宏

高建鹏 徐 健 唐 哲 杨 芳

史明霞 戴海龙 蒲 磊

编 委：（按拼音顺序排序）

戴海龙 杜志琴 高建鹏 何 燕 侯宗柳

解燕华 金醒昉 吕昭萍 毛希宏 孟明耀

蒲 磊 史明霞 唐维伟 唐 哲 王晋文

王文举 徐 健 杨 芳 张递思

序

干细胞研究是当今生命科学最前沿的领域之一，被广泛认为在细胞生物学、发育生物学、再生医学、动植物品种改良及其生物反应器研发、疾病机制及治疗、新药研发与评价等方面将扮演十分重要的角色。

干细胞技术近年来发展迅猛，并取得了令人兴奋的成果。如果说作为细胞治疗的免疫治疗，让人们看到了攻克肿瘤的可能，那么作为细胞治疗的另一个方向，干细胞疗法则在血液系统疾病、自身免疫性疾病、神经系统疾病等多种疾病的治疗以及组织修复与再生发挥了巨大的作用。随着科学家们研究的深入，干细胞将在许多目前医疗技术还不能治愈的各种难治性疾病的治疗上让人们看到了希望。

《围产期成体干细胞基础与临床应用》一书，内容比较广泛，对干细胞的分离培养、检定、干细胞库建立以及安全性评估等方面作了较为全面系统概述；另外，采用围产期成体干细胞对目前医学常规方法无法治愈的一些疑难疾病，如多发性硬化、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾小球肾病、移植物抗宿主病、自身免疫肝病、糖尿病、老年血管性痴呆、心肌梗塞的临床研究进行了介绍，还对围产期成体干细胞在组织工程中的应用进行了综述。该书是由有丰富的干细胞分离、培养、建库实验室研究人员和临床研究的经验医生撰写；在编著过程中，除了引用了较新的研究进展，还将本人研究的结果和经验倾注于书中。因此，《围产期成体干细胞基础与临床应用》是一部集干细胞基础和应用于一体的著作，具有较强的实用性，对干细胞研究具有指导作用。



国家干细胞工程技术研究中心主任

北京汉氏联合生物技术有限公司

2016年7月6日于北京

前言

1966年Freudenstein等观察到小鼠的骨髓细胞可在体外培养贴壁生长，并证明在体外可以分化为成骨细胞及脂肪细胞。20世纪70年代，在Freudenstein工作的基础上已经有大量的研究证明这种骨髓基质来源的贴壁细胞，具有成纤维细胞样形态而被称为集落形成单位成纤维细胞，后又称为间充质祖细胞即现在通称的间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSC）。此后间充质干细胞研究飞速发展，从骨髓、脐带、胎盘、羊膜、脐血和脂肪等多种组织中分离培养得到。由于来源不同，细胞分离扩增的方法存在差异，为此，国际细胞治疗学会（ISCT）制定了界定MSC的三条基本标准：①贴壁生长；②具有以下表型特征：CD105、CD73和CD90表达的细胞 $\geq 95\%$ 等，而绝大多数不表达CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a及CD19等，也不表达MHC II类分子，如HLA-DR抗原等；③具有分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞等3类细胞的能力，具有高度自我更新能力和分化潜能。

间充质干细胞研究日益受到广泛关注并显示出越来越广阔的应用前景。在细胞治疗、组织工程等领域具有极为重要的应用价值，是继造血干细胞之后临床应用研究最多，也是最成熟的一种成体干细胞。1995年Sensebél首次报道MSC应用于临床实验，迄今为止，培养扩增的MSC已被广泛地用于临床实验研究，如移植物抗宿主病（GVHD）、充血性心力衰竭、急性心肌梗死、II型糖尿病、脊髓损伤、软骨和骨损伤、克罗恩病等，另外，在肾脏、肌肉和肺的损伤修复中也有初步进展。虽然成体干细胞在许多疾病的临床研究中表现出令人振奋的疗效，但迄今为止，除了造血干细胞用于治疗血液系统恶性肿瘤外，尚未有其他成熟的成体干细胞作为常规的治疗方法进入临床实践。其中涉及的问题很多，包括干细胞疗法进入临床实践的政策法规保障、用来验证干细胞疗法安全性与有效性的合适的动物模型、临床治疗的评价方法与体系尚未完善、干细胞产品临床应用的技术标准及规范尚未健全以及相关的伦理学论证等。同时，MSC培养工艺从实验研究模式转向大规模生产临床级的MSC还需要根据临床应用的要求，对培养技术各方面进行深层次的评估。本书主要对胎盘来源间充质干细胞体外培养技术的系统、质控、安全性以及临床前及临床应用进行简要介绍。

目 录

第一章 胎盘干细胞移植治疗免疫系统疾病概述	1
第一节 胎盘干细胞的分类和基本功能	2
第二节 胎盘干细胞的分离和干细胞库	5
第三节 干细胞安全性评估及质量控制	7
第四节 干细胞临床前及临床研究	11
第五节 胎盘来源干细胞在临床应用中的优势	20
第二章 胎盘来源间充质干细胞分离和培养	25
第一节 脐血间充质干细胞分离培养技术	26
第二节 脐带间充质干细胞分离培养技术	31
第三节 羊膜间充质干细胞分离培养技术	35
第四节 绒毛膜间充质干细胞分离培养技术	38
第五节 羊水间充质干细胞分离培养技术	41
第六节 临床级胎盘来源间充质干细胞的大规模培养技术与稳定性研究	43
第三章 胎盘来源间充质干细胞的鉴定	57
第一节 胎盘来源间充质干细胞的增殖特性、生长周期	58
第二节 胎盘间充质干细胞的表面标记	64
第三节 胎盘间充质干细胞集落形成（CFU-F）实验	66
第四节 胎盘来源间充质干细胞的体外诱导分化	67
第四章 间充质干细胞与肿瘤	77
第一节 MSC具有恶性转化的倾向	78
第二节 MSC具有肿瘤组织趋向性	80
第三节 间充质干细胞与肿瘤间质形成	82
第四节 MSC对恶性肿瘤的影响	83
第五节 间充质干细胞作载体与肿瘤治疗研究	86
第六节 间充质干细胞与肿瘤治疗的临床应用	88

第七节	间充质干细胞致瘤性的评估	90
第八节	安全性的总体评价	91
第五章	胎盘间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮	95
第一节	SLE的临床表现及诊断	96
第二节	胎盘间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮的理论基础	103
第三节	胎盘间充质干细胞治疗SLE的临床应用	106
第六章	胎盘间充质干细胞治疗类风湿关节炎	111
第一节	RA患者的滑膜损害	112
第二节	胎盘间充质干细胞治疗类风湿关节炎的理论基础	115
第三节	胎盘间充质干细胞治疗类风湿关节炎的机制	117
第四节	问题和展望——PMSCs是否为RA治疗的最佳选择需深入研究	120
第七章	胎盘间充质干细胞治疗多发性硬化	123
第一节	多发性硬化概述	124
第二节	多发性硬化的临床表现及诊断	126
第三节	多发性硬化目前治疗方案及其发展进程	129
第四节	间充质干细胞移植治疗多发性硬化的理论基础和实验研究	131
第五节	间充质干细胞治疗多发性硬化的临床应用	133
第八章	胎盘间充质干细胞治疗GVHD	138
第一节	GVHD的概述	139
第二节	胎盘间充质干细胞在治疗GVHD的理论基础	144
第三节	胎盘间充质干细胞治疗GVHD的临床应用	145
第九章	间充质干细胞在自身免疫性肝病中的运用	150
第一节	自身免疫性肝病的临床特点	151
第二节	间充质干细胞治疗AILD的理论基础	156
第三节	骨髓间充质干细胞治疗自身免疫性肝病	159

第十章 胎盘间充质干细胞治疗肾小球疾病	163
第一节 肾小球疾病的概述	164
第二节 胎盘间充质干细胞治疗肾小球疾病的理论基础	169
第三节 胎盘间充质干细胞治疗肾小球疾病的临床应用	171
第四节 展望	172
第十一章 胎盘间充质干细胞治疗糖尿病	175
第一节 糖尿病概述	176
第二节 胎盘间充质干细胞治疗糖尿病的理论基础	187
第三节 干细胞移植在治疗糖尿病临床应用的现状	188
第四节 问题和展望	190
第十二章 脐带间充质干细胞治疗血管性痴呆	192
第一节 血管性痴呆的概述	193
第二节 脐带间充质干细胞在治疗血管性痴呆的理论基础	198
第三节 脐带间充质干细胞治疗血管性痴呆的临床应用	201
第十三章 胎盘间充质干细胞治疗心肌梗死	206
第一节 心肌梗死的概述	207
第二节 胎盘间充质干细胞在治疗心肌梗死疾病的理论基础	212
第三节 展望	215
第十四章 胎儿附属物干细胞与组织工程	218
第一节 概述	219
第二节 组织工程研究	220
第三节 胎儿附属物干细胞在组织工程中的应用	224
附录	236
干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（征求意见稿）	237
干细胞临床试验研究管理办法（试行）（征求意见稿）	245
干细胞临床试验研究基地管理办法（试行）（征求意见稿）	260
美国和欧盟国家成人间充质干细胞临床试验监管框架	270

1

第一章

胎盘干细胞移植治疗 免疫系统疾病概述

第一节 胎盘干细胞的分类和基本功能

1966年Freudenstein等观察到小鼠的骨髓细胞可在体外培养贴壁生长,并证明在体外可以分化为成骨细胞及脂肪细胞。20世纪70年代,在Freudenstein工作的基础上已经有大量的研究证明这种骨髓基质来源的贴壁细胞,具有成纤维细胞样形态而被称为集落形成单位成纤维细胞,后又称为间充质祖细胞即现在通称的间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)。此后间充质干细胞研究飞速发展,从骨髓、脐带、胎盘、羊膜、脐血和脂肪等多种组织中分离培养得到^[1]。由于来源不同,细胞分离扩增的方法存在差异,为此,国际细胞治疗学会(ISCT)制定了界定MSCs的三条基本标准^[2]:①贴壁生长。②具有以下表型特征:CD105、CD73和CD90表达的细胞 $\geq 95\%$ 等,而绝大多数不表达CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a及CD19等,也不表达MHC II类分子,如HLA-DR抗原等。③具有分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞等3类细胞的能力,具有高度自我更新能力和分化潜能。

间充质干细胞研究日益受到广泛关注并显示出越来越广阔的应用前景。在细胞治疗、组织工程等领域具有极为重要的应用价值,是继造血干细胞之后临床应用研究最多,也是最成熟的一种成体干细胞。1995年Sensebél^[3]首次报道MSC应用于临床实验,迄今为止,培养扩增的MSC已被广泛地用于临床实验研究,如移植物抗宿主病(GVHD)、充血性心力衰竭、急性心肌梗死、II型糖尿病、脊髓损伤、软骨和骨损伤、克罗恩病等,另外,在肾脏、肌肉和肺的损伤修复中也有初步进展。虽然成体干细胞在许多疾病的临床研究中表现出令人振奋的疗效,但迄今为止,除了造血干细胞用于治疗血液系统恶性肿瘤外,尚未有其他成熟的成体干细胞作为常规的治疗方法进入临床实践。其中涉及的问题很多,包括干细胞疗法进入临床实践的政策法规保障、用来验证干细胞疗法安全性与有效性的合适的动物模型、临床治疗的评价方法与体系尚未完善、干细胞产品临床应用的技术标准及规范尚未健全以及相关的伦理学论证等。同时, MSC培养工艺从实验研究模式转向大规模生产临床级的MSC还需要根据临床应用的要求,对培养技术各方面进行深层次的评估。本概述主要对胎盘来源间充质干细胞体外培养技术的系统、质控、安全性以及临床前及临床应用进行简要介绍。

胎盘由羊膜、叶状绒毛膜(也称丛密绒毛膜)和底蜕膜构成。羊膜构成胎盘的胎儿部分,是胎盘的最内层。叶状绒毛膜构成胎盘的胎儿部分,是胎盘的主要部分。底蜕膜构成胎盘的母体部分。胎盘呈圆盘状,嵌在子宫壁中,分娩时由于子宫肌层收缩使胎盘剥离而挤出子宫。胎盘作为胎儿的废弃物,其来源丰富,获得无创伤性,无伦理学限制,胎盘来源的干细胞避免了骨髓干细胞运用中病毒感染高风险性,并且有研究表明其得到的间充质干细胞数量丰富,在体外扩增明显优于骨髓等优点。

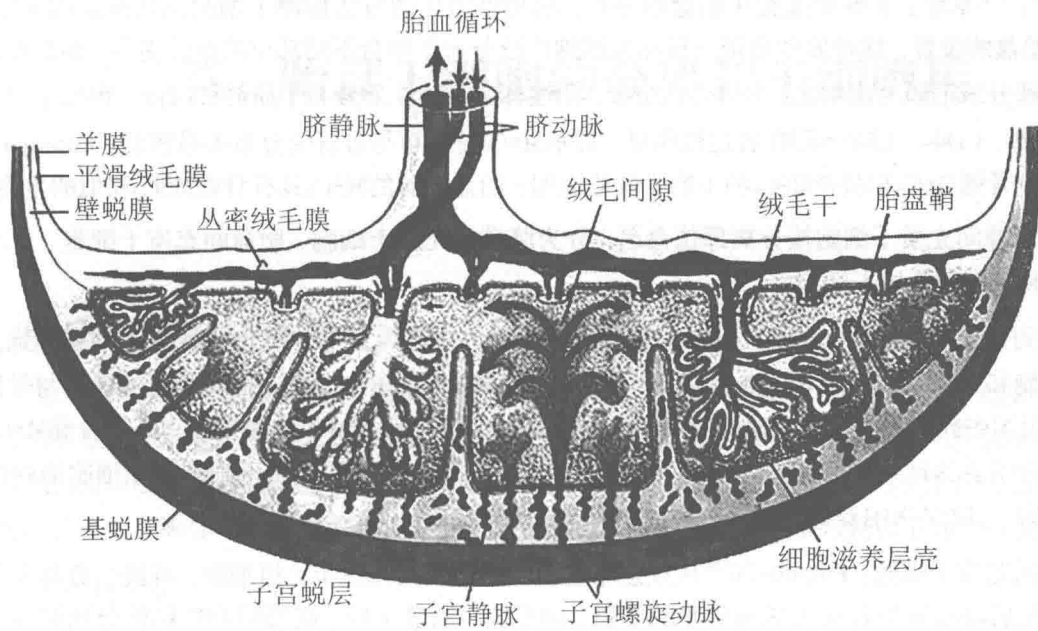


图1 胎盘模式图

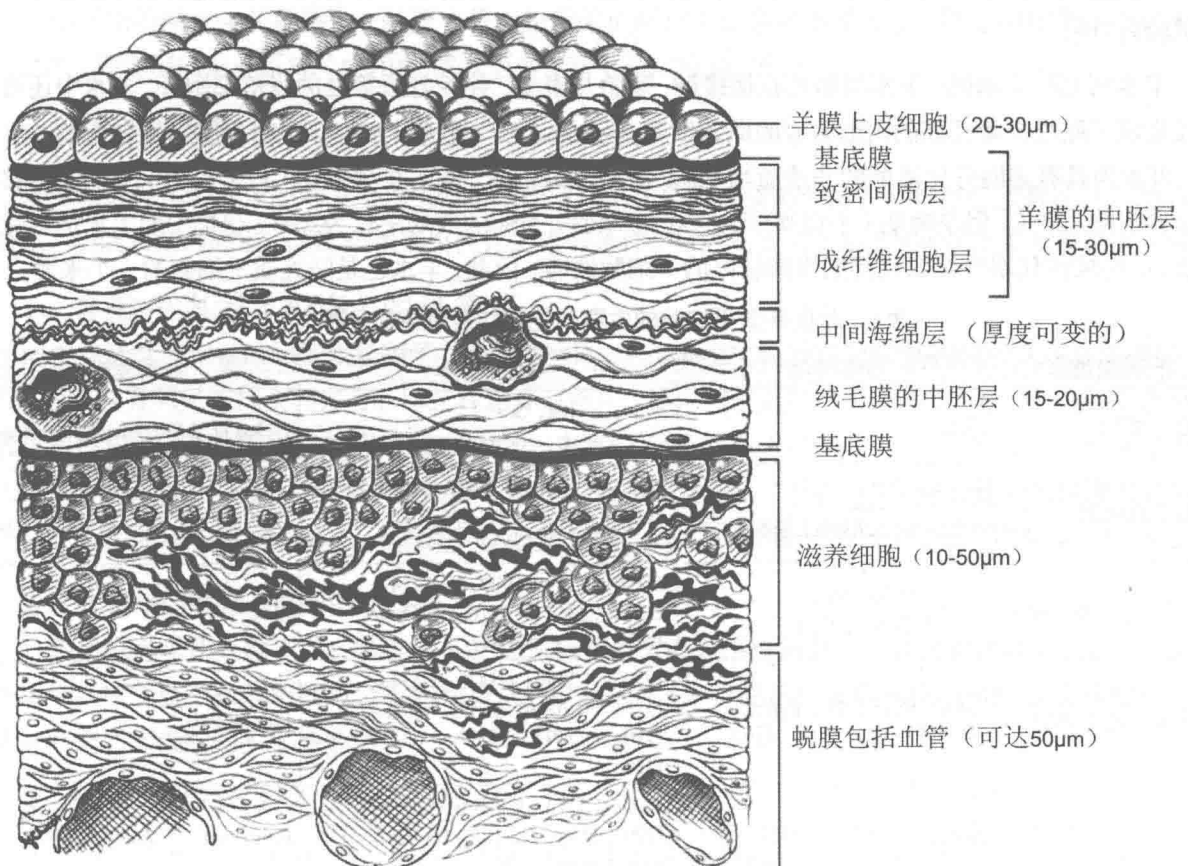


图2 胎盘组织模式图

苗宗宁^[4]等为了了解干细胞在胎盘的分布,用免疫组化的方法检测干细胞阳性标志CD44、CD29、CD166在胎盘的位置,结果发现携带三种标志细胞广泛分布于胎盘不同部位的血管周围、间质细胞、羊膜细胞以及部分绒毛膜上皮细胞。另外,在脐带,阳性标志细胞主要分布于脐静脉内皮/内皮下层。血管周围细胞CD29、CD44、CD166阳性表达较明显,提示MSCs的分布与血管的分布关系密切。Caterina Pipino^[5]等对比研究骨髓MSCs和脐带MSCs的生物学性质表明:胎盘来源的MSCs具有骨髓MSCs相似的生物学功能。

胎盘来源间充质干细胞按分离部位命名,分为脐带间充质干细胞、胎盘间充质干细胞、羊水间充质干细胞、脐带血间充质干细胞。

脐带间充质干细胞:2003年Romanov等^[6]从脐静脉内皮和内皮下分离出一种成纤维样细胞,可分化为脂肪细胞和成骨细胞。同年,Mitchell等^[7]从脐带Wharton's jelly中分离出间充质干细胞。与骨髓MSC相比,脐带组织中MSCs的含量大约为0.08%,较骨髓高8~80倍。脐带MSC的增殖能力高于骨髓MSC,CD106和HLA-I分子表达低于骨髓MSC。因此,脐带间充质干细胞较骨髓间充质干细胞对于细胞治疗是更理想的种子细胞。目前在NIH登记的脐带来源MSC临床试验有53项。

胎盘间充质干细胞:Fukuchi等^[8]从成熟胎盘小叶中得到间充质干/祖细胞,可表达数种干细胞标志基因。此后陆续有学者从人成熟胎盘的羊膜、绒毛膜、胎盘小叶、底蜕膜和壁蜕膜分离培养出间充质干细胞,经RT-PCR分析胎盘来源的间充质干细胞可表达中胚层、外胚层和内胚层的相关基因。体外培养的胎盘间充质干/祖细胞具有多向分化潜能和免疫抑制效应及支持造血功能,其增殖能力优于成人骨髓MSC。胎盘来源丰富、取材方便, MSC 易于分离,是MSC又一新来源。目前在NIH登记的胎盘来源MSC临床试验有7项。

羊水间充质干细胞:羊水与胎儿直接接触,除胎儿表皮、体腔管道等处的脱落细胞外,羊水中还可能存在来源于胎盘或桑葚胚的内细胞群的原始细胞。Streubel等^[9]发现羊水中存在向成肌细胞转化的羊水细胞,可能为具有多向分化潜能的非造血祖细胞。In't Anker等^[10]证实在孕中期(17~22周)羊水中能够分离培养出胎儿MSC,但孕晚期(平均38+周)羊水分离胎儿MSC的成功率仅为20%。孕早中期羊水增殖能力较强,已连续传代培养至42代仍然维持较好的干细胞性能。因此,羊水也是间充质干细胞的一个来源。

表1 胎盘来源干细胞的主要分化潜能及细胞表面标志

干细胞类型	分化潜能	细胞标志	参考文献
造血干细胞	造血	CD34, c-Kit, Sca-1, Gata-2, Gata-3和Runx-1	Gekas et al.Ottersbach&Dzierzak
羊膜上皮细胞	间充质、造血、肝、心肌、胰岛和神经细胞	OCT-4, Nanog, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81, EpCAM, E-cadherin, CD49d, CD49f, CK7	Fukuchi 等 ^[8]
绒毛膜间充质干细胞	脂肪、软骨、骨、骨骼肌和神经源性	CD105, CD90, CD73, CD44, CD29, CD13, CD166, CD49e, CD10, HLA-ABC	苗宗宁 ^[5]
羊膜间充质干细胞	脂肪、软骨、骨、骨骼肌、神经源性血管生成,胰岛	CD105, CD90, CD73, CD44, CD29, HLA-A, B, C, CD13, CD10, CD49c, CD49d, CD54, CD166	Fukuchi 等 ^[8]
脐带间充质干细胞	脂肪、骨、软骨、神经	CD90、CD73、CD105, CD44, CD29 CD54、CD166, CD49d, SH3, Oct-4、Sox-2、Nanog	Romanov, ^[6] Mitchell 等 ^[7]
羊水间充质干细胞	脂肪细胞、骨细胞、肌细胞、内皮细胞、神经元细胞和肝细胞系	Oct-4 和SSEA-4, MHC- I、HLA-A、B、C 阳性;性, CD90 和CD105 弱阳性;	Streubel等 ^[9] In't Anker等 ^[10]

第二节 胎盘干细胞的分离和干细胞库

一、胎盘干细胞的分离技术

来源于组织的间充质干细胞原始数量都是很有限的，要达到临床应用的细胞数量级，就必须经过体外的扩增培养。脐带、胎盘、羊膜来源的MSC存在于组织中，需要用胶原酶、胰酶、透明质酸酶等消化分离成单个细胞后，再进行分离纯化；也可采用组织块法，利用MSC具有迁移能力的特性获得直接贴壁的MSC。因此间充质干细胞体外扩增培养技术是MSC临床应用技术的关键。主要包括以下几个方面：

（一）培养环境

培养干细胞的环境必须在符合GMP的洁净实验室内进行。

（二）培养体系的选择

根据干细胞贴壁生长的特性，贴壁生长细胞常采取两种大规模的培养方法，符合GMP条件下临床级MSC生产，即多层的培养系统（1~10层或者更多）和生物反应器3D培养。

（三）培养基的选择

培养基是MSC培养效率和安全的关键。选择使用的培养基需要能够维持MSC在经过数次传代培养后的表型、功能和基因稳定，因此必须采用优化的培养条件。目前主要用于培养MSC的培养基有以下几种：

1. 含胎牛血清（FBS）的培养基

胎牛血清含有丰富的细胞生长因子、营养等物质。经典的MSC培养条件就是基础培养基添加FBS，但是FBS活性具有明显的批次间差异，而且在培养过程中，MSC胞浆蛋白中可能残留FBS，由此可能会导致患者过敏反应，以及可能引起如疯牛病（BSE）、克雅病（Creutzfeldt-Jakob disease）等疾病。FDA管理规范关于GMP生产细胞并没有绝对禁止使用FBS，但需要有安全证明（TSA）确保没有传染病传播的危险。另外，按照国际细胞治疗协会的《干细胞临床转化指南》对使用的FBS进行血清筛选，以减少批次间差异。

2. 不含动物血清的培养基

许多研究者采用人源产品，如输血安全级的人AB血清或血小板裂解物来替代动物血清。经许多研究小组证明，使用血小板裂解物可以有效地替代FBS，很多临床研究单位也倡议使用血小板裂解物来实现临床级间充质干细胞的扩增培养^[11]。

3. 成分确定的无血清培养基

无血清培养基（serum free medium, SFM）就是不需要添加血清，通过像鸡尾酒式的添加生长因子（如FGF2、PDGF、TGF- β ）就可以维持细胞在体外较长时间生长繁殖，能够维持培养的MSC主要的表型和功能特征^[12]，但是它们可能包含个别蛋白或大量蛋白组分。MSC是贴壁生长细胞，无血清、无蛋白培养基缺乏血清中的各种黏附贴壁因子如纤连蛋白、层黏连蛋白等，因此需要添加这些组分以保证细胞

贴壁。这就要求这些添加的蛋白无基因污染,对无血清培养基培养的MSC还需要进行相似的安全性研究,判断无血清培养基对MSC基因稳定性的影响是否会导致肿瘤的形成。虽然理想的MSC培养基还没有形成共识,但无血清培养基是临床级间充质干细胞培养的最终方向。

二、胎盘干细胞库建立

干细胞进行临床应用,必须建立干细胞种子库。干细胞种子库的建立,包括细胞种子的信息、冻存技术、保存三个环节,制定“干细胞库管理系统”,系统可准确、动态地反映储存库中的标本信息,从而大大提高和保证了对库存标本的管理效率和质量,在促进干细胞库规范化发展上具有重要的战略意义。

(一) 干细胞种子信息

一个合格的干细胞需要提供以下信息:①干细胞名称。②捐献者个人信息(姓名、性别、年龄、身份证号、国籍、工作单位、现家庭住址、电话号码/手机、住院号、配偶姓名)、传染病感染(乙肝两对半、TRUST、HIV、TP-ELISA、HCV、HTLV、EBV、CMV)检测结果合格者。既往史:无单基因和多基因疾病,包括心血管疾病和肿瘤。家族史:无单基因和多基因疾病,包括心血管疾病和肿瘤。③供体本人或家属签署组织捐赠知情同意书。④染色体检测结果。⑤细胞表面标志(CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD73, CD105, CD106, CD117, Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, HLA-ABC和HLA-DR)。

(二) 细胞冻存

细胞冻存技术是间充质干细胞临床应用中很关键的技术。冻存保护剂是深低温保存组织细胞不可缺少的部分。目前常用的低温保护剂有二甲基亚砜(DMSO)、甘油、糖类、羟乙基淀粉等。低温保护剂二甲基亚砜的浓度,以10%(v/v)保存效果较佳;甘油则以10%~15%(v/v)浓度为好。干细胞的冷冻最好采用程控降温仪进行。利用程控降温仪严格控制降温速度(1~3)℃/min,经过相变(-11~-15℃)热释放之后加快降温速度,降至-80℃或-90℃,再转入液氮中(-196℃)长期保存。

大量研究证明,保存的MSC并不改变MSC的生物学特性,如分化、生长和表面标志物。在临床使用中最主要的问题是冻存保护剂的毒性,但DMSO的毒性也可能被过度地评估,因为冻存的MSC在临床使用前需要进行洗涤,从而会将其毒性降至最低。

第三节 干细胞安全性评估及质量控制

一、胎盘干细胞的安全性^[13]

(一) 体外分离和扩增

间充质干细胞虽然存在于许多组织中都存在，但是其丰度都极低。因此，体外培养是完成细胞治疗必需的步骤。然而，与新鲜分离的间充质干细胞不同，细胞经体外培养扩增后，其生物学特性可能发生很大的变化。从培养体系的安全性来讲，间充质干细胞在体外培养过程中，与培养皿、分离液、血清、细胞因子等开放接触，易于受到热原和内毒素的污染，有造成受者医源性感染等不良反应的风险。

(二) 基因稳定性

人体组织中原始MSC含量很少，但是经过体外长期培养后可以扩增到很大的数量级。可以为临床应用提供大量的MSC。通常，成人骨髓MSC可以稳定培养6~10代，而胎盘脐带MSC可以传30~40代。经过高分辨技术分析体外扩增的人骨髓MSC，并没有发现DNA复制数的畸变。但是在MSC长期培养过程中，发现与衰老相关的CpG位点发生修饰改变。研究者对不同供者来源的MSC的核型分析的结果表明，一般10代以内的MSC核型比较稳定，未发现变异情况。超过10代的细胞，核型发生变异，成瘤性风险增大。人间充质干细胞体外培养连续传代超过20次后，虽然细胞不具备裸鼠致瘤性，但其原癌基因和抑癌基因表达特征与Ewing肉瘤相似。即使早期和晚期代数的MSC在基因组学上没有差异，也不能说明经过长期培养后基因组没有发生突变。突变的MSC可能不能存活或者因为正常MSC的优势生长，使得突变的MSC在长期培养过程中检测不出来。相反，如果突变的MSC具有优势生长或者耐受衰老，那么对于临床应用更具有风险。

(三) 致瘤性和促瘤性

由于大多数间充质干细胞制剂具有相对的弱致瘤性，因此在动物致瘤性试验中，针对不同类型的干细胞，选择必要数量的细胞和必要长的观察期。

在动物致瘤性试验不能有效判断致瘤性时，有必要检测与致瘤性相关的生物学性状的改变，如细胞对生长因子依赖性的改变、基因组稳定性的改变、与致瘤性密切相关的蛋白（如癌变信号通路中的关键调控蛋白）表达水平或活性的改变、对凋亡诱导敏感性的改变等，以此来间接判断干细胞恶性转化的可能性。

目前，普遍认为间充质干细胞“不致瘤”或具有“弱致瘤性”，但不排除其对已存在肿瘤的“促瘤性”作用。因此，根据各自间充质干细胞制剂的组织来源和临床适应证的不同，设计相应的试验方法，以判断其制剂的“促瘤性”。

二、胎盘干细胞的质量控制^[14]

由于体外传代增殖可能会使间充质干细胞的生物学效力、端粒酶、核型稳定性、组织相容性抗原、原癌基因、抑癌基因、增殖能力、分化潜能等发生改变，带来免疫毒性和致瘤风险；在保存、运输、复苏、配制过程中，细胞制品的存活率、生物学效力、均一性无时不在变化，难以保证间充质干细胞临床应

用的安全、有效。从产品的制备到使用的整个链条中,如何保证细胞的活性、生物学功能稳定性、遗传特征稳定性、质量可控性,直接关系到临床应用的安全和有效。

因此,质量监控包括生产环境的细菌和真菌的检测,药品化生产MSC的环境要求每2周至少进行一次无菌的检测。收获细胞质量控制必须确保含有足够量的干/祖细胞,能够达到临床应用的数量要求,还应排除传播传染性疾病的可能。质量控制应包括细胞培养的全过程。包括分离细胞前的供体血清学检测,主要是免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒等。对于原始干细胞数量的检测,现在唯一的定量检测是CFU-F,但是检测时间太长,不可能在取样时得到结果,只能作为后续的评判标准。因此,只有检测有核细胞数和活性来验证起始干细胞。培养过程中,要不断监测细胞。当MSC被分离出来后,确保分离的细胞质量良好。这些质控包括细胞计数、细胞活性鉴定、表型分析、CFU-F形成分析,细菌污染检测等。在治疗前必须对细胞进行质量判定,根据质控结果判定这些细胞是否能够被用于临床。这些质控方法必须快速、精确,适用于临床治疗要求。这样的质控包括细胞计数、评价细胞活性和流式测定细胞表型、细菌学检测、细胞功能、基因稳定性等。通常的MSC分化能力鉴定中,诱导分化需要2~3周才能知道结果,有研究者提出采用PCR方式检测一些可用于鉴别的基因,以检测MSC是否保持未分化状态以及它们的分化潜能。近来,MSC在培养过程中的变异风险引起了大家的注意,如何判定临床使用经体外扩增培养的MSC基因是否突变、细胞是否发生转化、细胞是否已经老化等问题成为研究者关注的热点。细胞发生转化过程主要表现在端粒酶表达、核型突变和注射到免疫缺陷小鼠内生生长肿瘤。这些风险使得必须进行特殊的质控,最快速的方法就是通过QPCR检测端粒酶。

(一) 胎盘来源间充质干细胞的鉴别

MSC是一种在多种组织中存在的干细胞,目前比较通用的是国际细胞治疗协会(ISCT)2006年推荐的套定义MSC的最低标准。流式细胞术以其高灵敏、高速度、多参数测量、获取形态学信息等方面的优势在干细胞的鉴定中得到应用。应用这一技术,不仅可以用于原代细胞或较低代次细胞的表型分析,还可以应用到细胞传代后的表型稳定性研究中。现在认为间充质干细胞CD73、CD90、CD105呈阳性,阳性率不低于95%;CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR呈阴性,阳性率不高于2%。

(二) 间充质干细胞的基因型分析

对于特定供者来说,其遗传基因型是特异的。不同的供者组织来源,它的遗传基因型是不同的:同一供者,在组织采集、分离时可能存在母体和胎儿细胞的交叉污染现象;同一实验室中常常同时培养各种不同组织来源的细胞(或细胞系),细胞间相互交叉污染的现象也时有发生。在组织分离、细胞培养过程中,同一供者的组织应该独立分离、传代和保存,应严格防止不同产妇组织操作过程的交叉污染。同时,应保持母体和胎儿组织的区分;同一实验室最大限度地避免不同细胞(或细胞系)间的交叉污染。在细胞原代培养、传代后、制剂分装后的不同阶段检测其遗传图谱,证明细胞制备的全过程中就是该细胞本身,来源单一,不存在任何与其他细胞的交叉污染。可以采用PCR-毛细管电泳分析方法,检测16个人STR(short tandem repeat)位点,将STR分型数据与ATCC、JCRB数据库进行对比分析。该方法灵敏度高、特异性强,可用于生产用人源细胞株/系间的鉴别。

(三) 细胞活率

细胞治疗是将活细胞回输于人体,细胞总计数和细胞活率直接关系到治疗效果。细胞活率是表示细胞是否具有生物学功能的最直观的指标,一般采用台盼蓝染色法,人工计数操作简单、快捷、成本低,但是计数误差也较大。可采用细胞快速分析仪,利用电子脉冲分析技术自动检测细胞数日、浓度、活率、

直径、体积、细胞碎片、细胞团等细胞状态的详细信息，克服了人为操作误差。

（四）生物学效力检测

细胞制品在回输前，需要保证经过数代的体外培养，仍能够保证生物学活性保持一个稳定水平，来预测细胞产品的体内活性。生物学效力测定系指采用生物学方法，以反映被测物的生物学效力为目的的测定方法。根据开发的细胞制品的药理作用研究结果以及临床适应证，选择与药理作用相适应的特异性受体细胞进行生物学效力的测定必要时需同时采用多种方法综合评价细胞制品的生物学效力。

MSC主要是通过调节T细胞的增殖来改变免疫系统的状态，从而达到治疗免疫系统疾病的目的，可采用RNA干扰等方法控制MSC的TNFRI表达水平，经过¹³⁷Cs照射的MSC与外周血单个核细胞（PBMC）体外共培养，并通过BrdU标记增殖细胞，ELISA法检测T细胞增殖情况，分析MSC的TNFRI表达量与T细胞增殖活性之间的关系；针对干细胞不同的适应证，例如促进血管新生、促进皮肤愈合、促进软骨形成等，需要建立不同的生物学效力检测方法，量化其生物学功能。

（五）细胞增殖能力检测

与正常的体外培养细胞相比，发生恶性转化的细胞往往获得更强的增殖能力，更短的倍增时间，更快的增殖速度。由于内外因素的变化，体外培养的正常细胞会逐渐发生衰老，衰老的细胞往往伴随着增殖速度的减缓，或失去增殖能力。

因此，有必要确定正常的间充质干细胞体外增殖的群体倍增时间范围，以此筛查出有可能发生恶性转化或衰老的间充质干细胞。检测细胞增殖能力的方法有：一种是直接的方法，通过直接测定进行分裂的细胞数来评价细胞的增殖能力；另一种是间接的方法，即细胞活力检测方法。基于细胞在较高的存活率（大于90%）时，以一定时间内干细胞增殖数量表示它的

增殖能力。以 1×10^6 个 / T75瓶接种，培养48h后消化计数。获得的细胞数量应在接种细胞数量的1.5~2.5倍范围内。

（六）分化潜能

间充质干细胞是一群具有自我更新能力和有多向分化潜能的细胞。但是在体外培养的过程中，有可能随着传代次数的增加、培养条件的改变等因素而逐渐失去其多向分化能力。只有检测了间充质干细胞的多向分化能力，才能保证其具有干细胞的基本特征。

采用常规的成骨诱导培养基（10%胎牛血清、0.1pmol/L地塞米松、0.2gmoL/L抗坏血酸、10mmol/L甘油2-磷酸）和成脂诱导培养基（10%胎牛血清、1gmoL/L地塞米松、0.5mmol/L IBMX、10μg/mL胰岛素、100gmoL/L吡哆美辛）对胎盘来源间充质干细胞进行分化诱导，然后通过茜素红和油红O染色确定其分化潜能。经过体外传代培养，胎盘间充质干细胞应保持向骨、脂肪分化的潜能

（七）细胞核型

人体来源的正常细胞具有46条正常染色体，但是在体外培养的环境下，染色体核型有可能表现为不稳定性，而染色体的畸变必然导致细胞生物学特征的改变，最危险的改变就是细胞发生转化，从而导致细胞的生长不再受到调控，而具备了类似肿瘤细胞的无限增殖的能力，这就是通常所说的恶性转化。而这种现象的发生严重威胁着体外扩增MSC的临床应用的安全性。

核型分析的检测以筛查供者是否有遗传缺陷和染色体畸变和监测体外传代过程中间充质干细胞是否

发生染色体畸变为目的。根据《人类细胞遗传学国际命名体制ISCN2005》建立的G显带法,获取不同世代数的MSC,通过秋水仙素处理,使之停留于分裂中期后,进行染色体数目检查和G显带分析,观察50个分裂象,染色体数目、核型无异常者判为合格。

(八) 原癌基因

原癌基因(proto-oncogene)是细胞内与细胞增殖相关的基因,是维持机体正常生命活动所必需的,在进化上高度保守。当原癌基因的结构或调控区发生变异,基因产物增多或活性增强时,使细胞过度增殖,从而形成肿瘤。体外培养的正常组织细胞也是一类具有增殖能力的细胞,其原癌基因也有一定程度的表达。确定正常组织原癌基因的表达水平,以此区分并预警发生恶性转化的间充质干细胞是一项十分重要的工作。

采用Real-Time PCR方法测定不同供者来源、不同代次胎盘间充质干细胞的原癌基因c-myc、Bmi-1、H-Ras的表达情况。

(九) 端粒酶

人类正常体细胞无端粒酶活性,而85%~90%的恶性肿瘤可检出端粒酶活性。人类细胞在胚胎发育早期,端粒酶呈活化状态,随后被抑制并一直处于失活状态,因而体细胞无端粒酶活性。当正常细胞发生癌变时端粒酶再度活化,以逃避正常的细胞衰老过程,获得无限增殖的潜能。因而,端粒酶再活化是恶性肿瘤一个显著的生物学特征。检测供者细胞以及在体外传代后端粒酶活性情况可以保证MSC安全性。

采用逆转录Real-Time PCR方法检测其是否表达端粒酶催化亚基基因hTERT。hTERT是端粒酶的核心,只表达于端粒酶阳性细胞,并且是端粒酶的限速因子,其mRNA表达水平直接决定端粒酶的活性程度。采用Real-Time PCR的方法检测干细胞应无端粒酶(或非常微弱)表达。

(十) 外源因子

作为临床应用的MSC制品,其纯净程度是十分重要的指标,这直接关系到临床应用的安全性,而纯净度主要影响因素是外源因子,例如病毒感染。病毒感染的主要来源首先是作为供者的生物体存在于自然界之中,暴露于各种感染因素之中,作为原料的供者组织可能受到病毒的污染,此外供者组织在手术获取、储运、分离培养过程中可能受到诸多感染因素的威胁。因此对于供者组织和MSC成品制剂的病毒检测就显得尤为重要,其可以尽可能地避免由于细胞治疗造成的感染性疾病的发生。

采用不同细胞传代培养法检测病毒因子,同时进行红细胞吸附实验,结果应为阴性。细胞制品的支原体检查应采用培养法和指示细胞培养法,均应无支原体生长。

(十一) 添加物残留量分析

在当前的细胞分离技术手段下,不可避免地会使用到一些非人体来源的物质加入到细胞分离培养的过程中,这就为MSC临床安全使用埋下了隐患。目前最常使用的引入成分有抗生素、胶原酶、蛋白酶、动物血清等。但是由于MSC的特殊性,应用于MSC的无血清培养基尚未取得突破性进展,这就使得牛血清的使用成为必然。因此在用于临床治疗的MSC中,牛血清残留量直接关系到MSC输注之后的安全性。我们采用双抗体夹心ELISA法,定量检测牛血清白蛋白(BSA),牛血清残留量每个剂量应不高于50ng,制订依据现行版药典生物制品中关于牛血清残留量的要求。另一方面,胰蛋白酶作为贴壁细胞培养过程中传代所必需的成分,也是无法替代的,因此对于制剂中胰蛋白酶含量的检测同样重要。