

# 人脐带间充质干细胞的产业化关键技术研究

潘兴华，庞荣清，阮光萍，蔡学敏，朱向情，何洁，赵晶，王强，王金祥，刘菊芬，沈丽蓉，杨建勇，朱光旭，李自安，吕燕波，石琳琳，马丽花

成都军区昆明总医院临床实验科，云南省干细胞工程实验室，昆明 650032

本文按照人脐带间充质干细胞（HU-MSC）“新药”产品申报及临床应用前研究要求，对 HU-MSC 的体外制备与鉴定、细胞资源库建设、临床级间充质干细胞制剂制备与质量控制技术进行研究并建立了相应措施技术规范，对 HU-MSC 制剂进行了体内急慢性毒性实验及治疗系统性红斑狼疮（SLE）的疗效与机制评价，解决了 HU-MSC 制备、制剂化和临床应用前的关键技术问题，为细胞产品产业化及临床转化应用奠定了技术和理论基础。主要研究内容和结果报告如下：

**一、脐带采集与质量控制：**对拟采集脐带的产妇进行产前健康检查，签订知情同意书，采集外周血，采用免疫学和基因扩增技术排除携带乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、人类免疫缺陷病毒（HIV）、EB 病毒、巨细胞病毒（CM）及细菌、支原体等。

**二、HU-MSC 分离、扩增：**无菌条件下采集健康足月妊娠的剖腹产脐带，在实验室内冲洗并剥离外膜，采用体外组织块贴壁培养法分离扩增脐带间充质干细胞，常规培养并建立了人脐带间充质干细胞规模化体外制备技术，每条 40CM 长的脐带，体外培养 20 天，可制备获得原代脐带间充质干细胞  $2 \times 10^8$  以上细胞，第一代传带培养可获得脐带间充质干细胞  $6 \times 10^8$  以上细胞。收集原代和 1 代细胞，低温储存作为种子细胞备用。为排除潜伏期病毒的可能性，对分离培养后的细胞进行破碎处理，采用基因扩增进行 HBV、HCV、HIV、CMV、EB 病毒检测，对不携带上述病原的细胞进行低温保存。

**三、HU-MSC 鉴定：**收集体外培养的 HU-MSC，采用流式细胞分析、免疫细胞化学和定向诱导分化技术对人脐带间充质干细胞进行表型标志和分化潜能分析。分离获得的 HU-MSC 高表达 CD105、CD106、CD24、CD29、CD44，不表达 CD34。体外可定向诱导分化为脂肪、神经和软骨细胞。研究表明，该细胞具有多向分化潜能，符合 HU-MSC 的主要表型和分化特性。

**四、HU-MSC 制剂制备及储存：**利用 1-3 代 HU-MSC 筛选了临床制剂配制方法，建立了以人血白蛋白和二甲基亚砷为保护剂，平衡液为分散剂的临床应用 HU-MSC 制剂制备技术，同时研究了低温冻存、复苏、运输等技术，通过筛选和优化，建立了 HU-MSC 制剂配制、包装、储存、复苏及运输技术规范。该研究为规模化生产 HU-MSC 提供了技术方法，为临床研究提供了一种标准化制剂。

**五、HU-MSC细胞库建设：**按照前期建立的细胞制备、鉴定、储存等技术，建立了规模化制备和储存HU-MSC的技术方案，储存储存了 1-2 代HU-MSC4000 人份（ $1 \times 10^7$ /份）种子细胞，实现了年制备储存 5000 人份的规模。该技术研究和资源库建设主要为HU-MSC产业化提供技术示范，为临床治疗技术研究提供标准化材料。

**六、HU-MSC急性毒性实验：**将HU-MSC按  $1 \times 10^5$ 细胞/只、 $5 \times 10^6$ 细胞/只的剂量，通过静脉输入BALB/C小鼠体内，观察了输入细胞后的小鼠急性溶血和过敏反应，结果证明给小鼠体内输入HU-MSC无急性毒性反应。

**七、HU-MSC慢性毒性实验：**分别以  $1 \times 10^6$ 细胞/kg、 $5 \times 10^6$ 细胞/kg、 $1 \times 10^7$ 细胞/kg的细胞剂量，每 2 周一次，连续 8 次对每组 10 只食蟹猴进行静脉注射人脐带间充质干细胞，末次注射后连续观察 3 个月，记录临床表现，处死实验动物，采取主要器官进行病理组织学分析。结果证明，输入不同剂量HU-MSC的动物临床表现和病理组织结构与对照组无明显差异，表明HU-MSC治疗无慢性毒性反应。实验期间， $1 \times 10^6$ 细胞/kg组死亡 1 只，解剖死亡原因为肠梗阻，与细胞输注无关。

**八、猴脐带间充质干细胞（MU-MSC）慢性毒性实验：**分别以  $1 \times 10^6$ 细胞/kg、 $5 \times 10^6$ 细胞/kg、 $1 \times 10^7$ 细胞/kg的细胞剂量，每 2 周一次，连续 8 次对每组 10 只食蟹猴进行静脉注射食蟹猴脐带间充质干细胞，经临床观察和主要器官的病理组织学分析，无明显慢性毒性反应。实验期间， $5 \times 10^6$ 细胞/kg组死亡 1 只，死亡原因为肺栓塞，经病理组织学观察，栓塞组织无细胞成份，专家讨论认为可能是深静脉或心血管血栓脱落所致，与脐带间充质干细胞输入无直接关系。

**九、HU—MSC 体外免疫调节功能研究：**采用体外脐带间充质干细胞与免疫细胞共培养法分析人脐带间充质干细胞对免疫功能的体外调节作用。采集脐带分离脐带间充质干细胞（Umbilical cord mesenchymal stem cell, UCMSC），与淋巴细胞（Lymphocyte）按一定的比例进行体外共培养实验，采用 ELISA 法检测共培养上清细胞因子浓度（IL-4、IL-10、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 和 IFN $\gamma$ ）的变化，采用流式细胞分析法观察淋巴细胞亚群（CD4/CD8）的比例变化。结果发现脐带间充质干细胞具有抑制 CD3 比例，使 Treg 细胞比例最高，IFN $\gamma$  表达，提高 IL-10、TGF 表达的作用。

**十、HU-MSC治疗系统性红斑狼疮的疗效研究：**分离培养C57BL小鼠脐带MSC并采用DiR标记。分别给正常C57BL小鼠和系统性红斑狼疮（SLE）C57BL小鼠，每周一次，每次  $3 \times 10^5$ 个细胞，连续 4 周静脉注射小鼠脐带MSC。对实验鼠进行肝、肾、脾、肺等组织进行病理组织学观察，采用小动物体内成像观察移植细

胞的体内分布,采用ELISA法分析血液抗核抗体,采用PCR法分析OPG、RANKL、IL-17和Foxp3四个基因的表达情况,同时观察24小时尿蛋白水平。结果表明,系统性红斑狼疮C57BL模型鼠移植脐带MSC后,细胞在肝、脾、肾有明显分布,肝、脾、肺组织结构明显改善,抗核抗体和尿蛋白水平明显下降。提示小鼠脐带MSC对SLE有治疗作用,对模型鼠的SLE相关指标有明显改善。

**十一、HU-MSC的致瘤与促瘤实验:** 选用来源于两个不同的供者且三种不同代次的脐带间充质干细胞:hUC-MSC1和hUC-MSC2的P5、P7、P10代次,分别以 $1 \times 10^7$ 个/只的剂量,右侧腋窝皮下接种于NOD SCID小鼠,同时设宫颈癌Hela细胞为阳性对照组,人胚肺二倍体成纤维细胞MRC-5为阴性对照组,10只/组,雌雄各半。结果:所有动物在观察期内,精神状态良好,行为活动正常,动物体重呈现持续增长状态,组间动物体重未见明显差异( $P > 0.05$ )。观察期间供试品有4个组共6只动物在不同时间发生突发性死亡,大体解剖均未见明显异常,镜检未见与供试品相关毒性,仅一只动物为自发性炎症,其余死因不明。阴性对照组:注射部位未见明显结节,在D21安乐死半数动物,大体解剖观察未见各脏器或组织有异常现象,镜检可见仅1只动物接种局部组织淋巴细胞结节2个,伴有成纤维细胞增生结节。16周结束进行安乐死,期间各动物接种部位及周围均未见结节生长。阳性对照组:接种部位D8时开始出现结节,逐渐隆起、变硬且体积逐渐增大;在D61时安乐死,大体解剖观察见10只动物均在右侧腋下有结节、质硬,镜检腋下结节均为肿瘤结节。供试品6个组,包括两个来源的三个代次细胞,在接种细胞D5均可见结节,但结节均表现为退行性生长状态。在结节全部消失前D11安乐死半数动物,大体解剖观察未见各脏器或组织有异常现象,镜检可见给药局部干细胞团块坏死,周围纤维组织增生伴有淋巴细胞浸润。剩余半数动物至16周结束进行安乐死,期间各动物接种部位及周围均未见结节生长,大体解剖观察未见接种部位结节、各脏器或组织未见异常现象,镜检未见接种局部异常。结论:在本试验条件下,源于两个不同的供者的三个代次的脐带间充质干细胞,hUC-MSC1和hUC-MSC2的P5、P7、P10代,分别以 $1 \times 10^7$ 个/只剂量皮下接种给予NOD SCID小鼠,未见NOD SCID小鼠接种部位皮下有肿瘤性结节生长。

**十二、项目实施的旁效应:** 该项目在省级发改委战略性新兴产业专项、省级

科技厅社会发展专项支持下实施。依托该项目实施，建立了省级干细胞工程实验室、细胞治疗技术重点实验室、细胞工程转化医学研究所和市级干细胞与再生医学研究重点实验室，培育获得了省级成体细胞治疗技术创新团队和市级干细胞与再生医学研究科技创新团队认定。基于该项目的研究结果获得国家自然科学基金、国家科技支撑计划及省级科技平台建设重点项目等 12 个项目支持。上述平台建设、团队认定和项目支持，为进一步推进干细胞技术产业和临床转化应用奠定了良好基础。