

干细胞产品质量研究与检测专栏

[编者按]

干细胞是一类原始且未分化,具有自我更新,自动归巢,免疫原性低,多向分化潜能以及再生各种组织器官潜在功能的细胞,对多种难治性的人类重大疾病具有潜在治疗意义。多年来,各国对干细胞研究和临床转化非常重视,出台了一系列干细胞产品的相关指南,用于指导干细胞临床应用。2008年国际干细胞研究协会(ISSCR)制定了《干细胞临床转化指南》,2009年国际干细胞组织(ISCF)制定了《人胚胎干细胞建库和供应指南》,为干细胞临床转化研究奠定了基础。此后,美国食品药品监督管理局(FDA)、欧洲药品管理局(EMA)、世界卫生组织(WHO)、药品注册的国际协调组织(ICH)、ISSCR和ISCF等机构对干细胞从起始原材料到最终产品的质量控制、临床前和临床研究等进一步制定技术规范并更新了指南。截止到2024年10月23日,以“stem cell”作为关键词,搜索全球在clinicaltrials.gov注册的干细胞治疗临床试验方案有13 021项,统计有研究结果的项目1 942项,目前国际上已有20余种干细胞药物批准上市,干细胞治疗已成为各国研究的热点。

我国于2015年7月20日由原国家卫生和计划生育委员会和原国家食品药品监督管理总局联合发布了《干细胞临床研究管理办法(试行)》,同年7月31日,两部委又共同组织制定了《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》,以确保干细胞治疗的安全性和有效性。近年来,国家药品监督管理局药品审评中心出台了一系列相关指导原则,包括《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》(2017.12),《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》(2023.04),《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则》(2024.01)。截止到2024年12月底,我国共有159项干细胞药物向NMPA提交了IND申请,其中117项获临床默许,适应症包括:肺纤维化、膝关节关节炎、骨折、肝硬化、慢加急性肝衰竭、脑卒中、类风湿关节炎、糖尿病足溃疡、克罗恩病等。2025年1月2日,我国首款干细胞治疗药品-艾米迈托赛注射液(商品名:睿铂生)批准上市,标志着我国在干细胞治疗领域迈入了新阶段。

与其他药品相比较,干细胞具备自我更新和多向分化潜能,因此,干细胞产品的细胞类型多样,产品细胞本身具备体内生存、增殖、分化、细胞间相互作用等能力。干细胞产品作为一种活的无菌注射药物,生产过程中其干细胞来源、类型、扩增、基因修饰、诱导分化等存在较大差异,因此干细胞产品的均一性和稳定性相对较差,使用的时间窗口较短,其质量控制过程更加复杂,需要建立相应的快速有效的检验新方法新技术。为此申请并承担了北京市科委CGT课题研究任务“基因修饰免疫细胞和基因治疗药物质量控制关键技术与服务平台建设”部分项目,建立了相应的包括干细胞产品检验检测的新方法,为企业申报干细胞产品临床研究或新药审批进行检验奠定了基础。

为迎接即将到来的干细胞产品的研究热潮,我们组织干细胞产品质量分析专业人员撰写相关论文数篇,特设3期“干细胞产品质量研究与检测专栏”,内容涉及干细胞产品质量控制检测新技术新方法以及干细胞检测实验室质量体系的构建。本期4篇文章,包括“干细胞产品质量控制分析方法研究进展”“间充质干细胞产品生物学活性检验方法建立”“间充质干细胞端粒酶催化亚基RT-qPCR方法的建立”“AAV载体-HPV16-HPV18-HPyV假病毒的构建及其在干细胞人源病毒检查中的应用”。希望借助专栏的内容,为相关企业及研究机构提供参考,促进干细胞产品的临床研究和产业化进程。

[特邀栏目主编:饶春明、庞琳]



Special Column for Quality Research and Evaluation of Stem Cell Products

[Editor's Note]

Stem cells are a class of primitive, undifferentiated cells characterized by their capacity for self-renewal, intrinsic homing capability, low immunogenicity, multipotent differentiation potential, and the ability to regenerate various tissues and organs. These unique biological properties make them a promising therapeutic tool for numerous intractable and severe human diseases. Over the years, the significant global attention has been directed toward advancing stem cells research and clinical translation, with the publication of a series of guidelines to facilitate their clinical application. In 2008, the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) published the Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells. In 2009, the International Stem Cell Forum (ISCF) released the Guidelines for the Derivation and Distribution of Human Embryonic Stem Cell Lines, which provided foundational standards for the translational development of stem cell-based therapies. Subsequently, regulatory agencies, including the U.S. Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMA), the World Health Organization (WHO), the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), ISSCR, and ISCF, have developed technical specification and updated technical guidelines. These guidelines encompass quality control from the procurement of raw materials to the final product, as well as preclinical and clinical studies. As of October 23, 2024, a keyword search for “stem cell” on ClinicalTrials.gov identified 13 021 globally registered clinical trials focused on stem cell-based therapies, including 1 942 studies with published results. To date, over 20 stem cell-based pharmaceutical products have been approved for market worldwide. Stem cell therapy has thus emerged as a critical focus in international biomedical research, driving innovation and advancing the frontiers of regenerative medicine.

In our country, the National Health and Family Planning Commission and the China Food and Drug Administration jointly issued the Administrative Measures for Stem Cell Clinical Research (Trial) on July 20, 2015. Shortly thereafter, on July 31, 2015, the two agencies collaboratively formulated the Guidelines for Quality Control of Stem Cell Preparations and Preclinical Research (Trial) to ensure the safety and efficacy of stem cell therapies. In recent years, the Center for Drug Evaluation (CDE) of the National Medical Products Administration (NMPA) has released a series of relevant technical guidelines, including: Technical Guidelines for Research and Evaluation of Cell Therapy Products (Trial) (December 2017), Technical Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of Human Stem Cell Products (Trial) (April 2023), and Technical Guidelines for Nonclinical Research of Human Stem Cell Products (Trial) (January 2024). As of the end of December 2024, a total of 159 stem cell pharmaceutical products have submitted IND applications to the NMPA. Among these, 72 products have been granted clinical trial approval by default. The indications for these therapies include pulmonary fibrosis, knee osteoarthritis, bone fractures, liver cirrhosis, acute-on-chronic liver failure, stroke, rheumatoid arthritis, diabetic foot ulcers, Crohn's disease, and others. On January 2nd, 2025, China's first stem cell therapy drug, Amy Metotrexate Injection (trade name: Ruibo Sheng), was approved for marketing, marking a new stage in China's stem cell therapy field.

Compared with other pharmaceuticals, stem cells possess self-renewal and multipotent differentiation capabilities. As a result, stem cell products exhibit diverse cell types, with the cells themselves capable of *in vivo* survival, proliferation, differentiation, and intercellular interactions. As living, sterile injectable medicines, stem cell products are exposed to significant variability in aspects such as cell source, type, expansion, genetic modification, and induced differentiation during production. This inherent heterogeneity and instability result in relatively short usage windows and present challenges in ensuring consistent quality. Consequently, quality control for stem cell products is

more complicated, necessitating the development of novel, rapid, and effective testing methodologies and technologies. To tackle these challenges, we applied for and undertook part of the CGT (Cell and Gene Therapy) research project funded by the Beijing Municipal Science and Technology Commission. The project, titled Key Technologies for Quality Control and Service Platform Construction for Genetically Modified Immune Cells and Gene Therapy Drugs, includes the development of innovative testing methods for stem cell products. These advancements lay a foundation for enterprises to conduct testing required for clinical research applications or new drug approvals for stem cell products.

To embrace the forthcoming boom in stem cell product research, we have organized a team of stem cell product quality analysis experts to author several specialized articles. These contributions form a three-part series titled Special Column on Quality Research and Evaluation of Stem Cell Products. The series covers novel techniques and methods for quality control and testing of stem cell products, as well as the establishment of quality systems for stem cell testing laboratories. This issue features four articles, including: “Research Progress on Quality Control Analysis Methods for Stem Cell Products” “Biological Activity Methods Development of Mesenchymal Stem Cell Products” “Establishment of RT-qPCR Method for Telomerase Catalytic Subunits of Mesenchymal Stem Cells” and “The Construction of AAV Vector-HPV16-HPV18-HPyV Pseudoviruses and Application in the Examination of Human-derived Viruses in Stem Cells”. We hope the insights shared in this column will serve valuable opinions for relevant enterprises and research institutions, accelerating the clinical research and industrialization of stem cell products.

[Invited Column Editor-in-chief: RAO Chun-ming, PANG Lin]

干细胞产品质量控制分析方法研究进展*

杨英, 饶春明**

(北京昭衍药物检定研究有限公司, 北京 102605)

摘要: 干细胞是一类具有不同程度增殖、自我更新和分化潜能的细胞, 在再生医学和多种疾病治疗领域有重要作用。建立干细胞产品的质量控制方法和质量标准是保证产品安全、有效的重要条件。本文综述了干细胞产品质量控制的相关法规和指南, 并对干细胞的基本生物学特性、微生物学安全性、生物学安全性、生物学有效性和其他常规检测项目的检测方法和质量研究方法进行了概述, 进一步拓展至基因修饰的干细胞产品及干细胞来源的功能细胞和外泌体的质量研究方法。

关键词: 干细胞产品; 质量控制; 质量标准; 分析方法; 安全性; 生物学有效性

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)01-04-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1299

Research progress on quality control analysis methods for stem cell products*

YANG Ying, RAO Chun-ming**

(JOINN Pharmaceutical Quality Research and Testing (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102605, China)

Abstract: Stem cells have varying degrees of proliferation, self-renewal, and differentiation potential, and can be applied in regenerative medicine and the treatment of various diseases. To ensure safety and effectiveness of stem cell products, it is important to establish quality control methods and standards. Herein, we review the regulations and guidelines for stem cell products, and provide an overview of the detection assays on the basic biological characteristics, microbiological safety, biological safety, biological effectiveness and other conventional testing methods and quality research methods for stem cells. We further describe the quality research methods for genetically modified stem cell products, functional cells derived from stem cells, and extracellular vesicles, etc.

Keywords: stem cells products; quality control; quality standards; analytical methods; safety; biological effectiveness

干细胞具有独特的自我更新能力和多向分化潜能, 为再生医学、疾病治疗以及药物研发等领域提供了无限可能^[1]。干细胞产品作为一种细胞治疗产品, 其来源、成分、治疗机制、生产过程等比较复杂, 干细

胞产品的质量控制比化学药品要求更高, 而且干细胞输注到体内可能存在细胞增殖分化, 没有明确的 PK/PD 特征, 体外实验不能完全模拟体内微环境。在干细胞产品的研究开发以及规模化生产过程中, 如何

* 北京市科技计划课题: 基因修饰免疫细胞和基因治疗药物质量控制关键技术与服务平台建设(Z221100007922015)

** 通信作者 Tel: (010) 67869966; E-mail: raochunming@joinn-lab.com

第一作者 Tel: (010) 67869966; E-mail: yangying@joinn-lab.com

控制产品的质量,保证其安全性和有效性是这类产品获得成功应用的关键。截止到 2024 年 10 月 23 日,以“stem cell”作为关键词,搜索全球在 clinicaltrials.gov 注册的干细胞治疗临床试验方案有 13 021 项,统计有研究结果的项目 1 942 项。到 2024 年 12 月底,我国共 159 项干细胞药物向国家药品监督管理局(NMPA)提交了新药研究申请(investigational new drug application, IND)申请,其中 117 项获临床默许。国际上已批准干细胞药物 20 余种,2025 年 1 月 2 日,我国首款干细胞治疗药品—艾米迈托赛注射液(商品名:睿铂生)上市,这一突破性进展标志着中国在干细胞治疗领域的研发和应用迈入了新的阶段。干细胞质量对于临床应用具有决定性的意义,高质量的干细胞能够确保治疗效果,降低免疫反应和发生并发症的风险,提高患者的生存质量。本文针对干细胞产品的质量控制分析方法及质量研究策略进行介绍。

1 干细胞标准及相关指南

国际上已出台了多个干细胞产品的相关指南用于指导干细胞临床应用,主要由美国和欧洲国家主导。早期制定的干细胞质量控制规范是 2008 年由国际干细胞研究协会(international stem cell forum, ISSCR)制定的《干细胞临床转化指南》,以及 2009 年国际干细胞组织(international stem cell forum, ISCF)制定的《人胚胎干细胞建库和供应指南》,为干细胞临床转化研究奠定了基础。此后美国食品药品监督管理局(FDA)、欧洲药品管理局(EMA)、世界卫生组织(WHO)、药品注册的国际协调组织(ICH)、国际干细胞研究协会(ISSCR)和国际干细胞组织(ISCF)等机构对干细胞原材料的质量控制、临床前研究质量控制等进一步制定并更新了规范^[2]。国际主要关于干细胞质量的相关指南及规范见表 1。

表 1 国际干细胞相关指南及规范

Tab. 1 International guidelines and standards of stem cells

发布机构 (publishing agency)	指导原则 (guiding principle)	发布时间 (release time)
ICH	《生物技术/生物制品质量指南:用于生产生物技术/生物学制品的细胞基质的衍生和表征》[Guidance on Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244, September 21, 1998)]	1998
FDA	FDA 审查员和赞助商指南:人体体细胞治疗研究新药申请(IND)的化学、制造和控制(CMC)信息的内容和综述[Guidance for FDA Reviewers and Sponsors. Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)]	2008
FDA	《行业指南:细胞和基因治疗产品的效力测试》(Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products)	2011
EMA	《关于干细胞药物的意见书》(Reflection Paper on Stem Cell-based Medicinal Products)	2011
FDA	《人体细胞、组织和细胞组织产品监管偏差报告》(Deviation Reporting for Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-based Products Regulated Solely Under Section 361 of the Public Health Service Act and 21CFR Part 1271)	2017
FDA	《人类基因疗法新药申请(INDs)的化学、制造和控制(CMC)信息》[Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)]	2020
ISSCR	《干细胞研究和临床转化指南》(Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation)	2021
FDA	《用于细胞和基因治疗以及组织工程制品生产的人源和动物源材料的使用考虑》(Considerations for the Use of Human and Animal-Derived Materials in the Manufacture of Cellular and Gene Therapy and Tissue-Engineered Medical Products)	2024

2015 年 7 月 20 日原国家卫生和计划生育委员会和原国家食品药品监督管理总局联合发布《干细胞临床研究管理办法(试行)》,是我国首个针对干细胞临床研究管理的规范性文件,旨在规范干细胞临床研究行为,保障受试者权益,促进干细胞研究健康发展。《干细胞临床研究管理办法(试行)》明确从事干

细胞临床研究的医疗机构必须具备三级甲等医院、药物临床试验机构资质和干细胞临床研究相关条件,医疗机构不得向受试者收取干细胞临床研究相关费用,不得发布或变相发布干细胞临床研究广告。同时,为了加强干细胞制剂和临床研究质量管理,原国家卫生和计划生育委员会和原国家食品药品监督管理总局



于同年 7 月 31 日共同组织制定了《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》,确保干细胞治疗的安全性和有效性。近几年,国家药品监督管理局

药品审评中心(CDE)针对细胞治疗产品和干细胞及其衍生细胞治疗产品陆续出台了一系列指导原则,见表 2。

表 2 我国干细胞相关指导原则

Tab. 2 Guidelines of stem cells in China

序号 (No.)	指导原则 (guiding principle)	发布时间 (release time)
1	《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》(Guiding Principles for Research and Evaluation of Cell Therapy Products (Trial))	2017.12
2	《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》[Guiding Principles for Pharmaceutical Research and Evaluation of Immune Cell Therapy Products (Trial)]	2022.05
3	《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行)》[Guiding Principles for Pharmaceutical Research and Evaluation of In Vitro Gene Modification Systems (Trial)]	2022.05
4	《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》[Guiding Principles for Pharmaceutical Research and Evaluation of Human Stem Cell Products (Trial)]	2023.04
5	《人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行)》[Technical Guidelines for Clinical Trials of Human Stem Cells and Their Derived Cell Therapy Products (Trial)]	2023.06
6	《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则》(Guidelines for Non Clinical Research Techniques of Human Stem Cell Products)	2024.01

需要强调的是干细胞产品需遵守 2019 年 8 月颁布的《药品管理法》、2020 年 1 月颁布的《药品注册管理办法》和 2011 年 1 月实行的《药品生产质量管理规范》,并在此基础上需要按照 2020 年版《中华人民共和国药典》三部总论的〈生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制〉要求进行干细胞库的检定。

2023 年 9 月 23 日,第四届中国干细胞与再生医学协同创新平台大会正式发布了我国首个人源干细胞国家标准《生物样本库多能干细胞管理技术规范》(GB/T42466-2023),标志着我国在干细胞样本库管理上有了标准技术支撑,对于推动我国干细胞研究和应用的规范化、标准化发展具有重要意义,也为干细胞领域后续相关标准的制定提供了先行示范。

此外,各省市及学会等根据需求也制定了相应的规范,如中国细胞生物学学会组织编写的《人间充质干细胞团体标准》,中国医药生物技术协会组织编写的《干细胞制剂制备质量管理自律规范》,深圳市细胞治疗协会组织编写的《临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范》和中国整形美容协会组织编写的《干细胞制剂制备与质检行业标准(试行)》等。

在干细胞产品管理趋于规范的同时,干细胞领域数据也在同步加速增长,但干细胞数据相关国际标准长期缺乏,导致干细胞研究数据管理不规范,共享应用效率低等问题。2024 年 10 月 30 日,由我国专家牵头制定的全球首个干细胞数据国际标准

ISO8472-1 正式发布,将为干细胞领域数据管理提供规范和指导,提升全球干细胞数据管理水平,为干细胞数据国际标准提供依据,为推动干细胞研究和应用贡献“中国智慧”。

2 干细胞质量控制分析方法

建立严格的质量控制体系,深入开展干细胞质量研究,并建立针对不同类型干细胞的质量标准,对于推动干细胞治疗的广泛应用具有重要意义。目前按药品进行研发的人源干细胞产品主要包括人成体干细胞(adult stem cells, ASCs)、人胚干细胞(embryonic stem cells, ESCs)及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)3 大类。参考 2023 年 CDE 发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》开展干细胞产品的质量控制在,对其从起始原材料到成品进行全生命周期的质量控制,包括人、机、料、法、环 5 个方面。干细胞产品检定内容主要包括基本生物学特性、微生物学安全性、生物学安全性、生物学有效性及其他常规检测项目,涵盖细胞培养法、分子检测法、病毒检测法、蛋白标志物检测等多项技术。

2.1 基本生物学特性

2.1.1 细胞形态 通过倒置显微镜观察干细胞形态,如间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)呈纺锤形, ESCs 与 iPSCs 具有相似的形态,呈圆状、质密且稍扁平的特征等。目前干细胞的形态学鉴定

主要依据技术人员根据经验判断,尚没有统一的标准。如何结合图像分析技术判定细胞形态是可以发展的方向之一,已有研究报道采用计算机模拟技术分析 iPSCs 图像,通过对细胞核的形态分析判定细胞状态,尽管还在研究阶段,但也提示 AI 技术与显微镜结合将为细胞形态的判定提供帮助^[3]。

2.1.2 细胞鉴别 采用 STR 分型技术、DNA 条形码技术(DNA barcoding)和染色体核型分析进行细胞鉴别。STR 分型技术通过分析多个 STR 基因座,可以准确地判断细胞是否存在交叉污染及交叉污染的类型,该技术具有高通量和系统化的特点,结果更加准确、客观。Paul Hebert 首先倡导将 DNA 条形码技术应用到生物物种鉴定中,该技术是利用一段标准 DNA 序列作为标记来实现快速、准确和自动化的物种鉴定,常采用进化保守的线粒体 COI 基因^[4]。染色体核型分析用于评估细胞的染色体数目和结构,包括染色体易位、缺失等异常,也是评估细胞遗传稳定性的关键指标^[5],按照 2020 年版《中华人民共和国药典》进行。

2.1.3 细胞活性 可通过细胞活率、活细胞数、群体倍增时间(PDT)、细胞周期等对细胞活性进行综合评价。细胞活率、活细胞数和群体倍增时间通过细胞计数法进行,可采用台盼蓝染色或 AO/PI 染色法,自动化细胞计数仪进行。细胞周期可采用流式细胞术进行检测,荧光标记法染色(如碘化丙啶),采用细胞周期分析软件分析不同细胞时相细胞分布。

2.1.4 生物标志物 细胞表面标志物可对细胞类型、多能性、谱系、终末分化和/或功能进行表征,常采用相关分析检测方法如流式细胞术、蛋白免疫印迹(western blot, WB)、免疫荧光等。流式细胞术主要用于分析细胞表面蛋白, WB 可用于分析细胞总蛋白含量,免疫荧光法可检测细胞标志蛋白在细胞中的定位。基于不同干细胞类型的生物学标志物存在差异,如国际 MSCs 标准将 MSCs 判定为 CD105、CD73 和 CD90 表达阳性, CD45、CD34 或 CD11b、CD79a 或 CD19、HLA-DR 表达阴性^[6];造血干细胞的表面标志物为 CD34、CD133 和 CD90 阳性, CD38 阴性^[7];人胚干细胞表达 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Thy1 等^[8]。上述表面标志物以流式细胞术检测为主,采用特异性抗体标记,具有灵敏、快速的特点,适合干细胞产品快速放行。

此外,新技术的兴起为发现特异干细胞标志物提供了新方法。蛋白质组学技术在发现与疾病相关的

生物标志物方面具有极大的优势,可以对蛋白质的表达水平、修饰状态和相互作用进行研究。应用蛋白质组学技术开展干细胞质量研究,鉴定细胞特异性或阶段特异性的表面标志蛋白,将有利于对干细胞分化等进行更精准的调控和追踪。尽管已有多种表面标志物可用于鉴定不同的干细胞类型,但有的表面标志物缺乏特异性,如 Thy1 在 ESCs 和成纤维细胞均表达。而且,根据临床应用的要求,分离处于特定发育阶段的干细胞用于临床特定疾病的治疗具有重大的意义,因此亟需发现更可靠的细胞表面标志物。已有研究表明,采用蛋白质组学技术发现了 iPSCs 或 ESCs 细胞的其他特异表面标志物,如 iPSCs 的表面标志物 CD147、F2(CD98)、AT1B3(CD298)和 TFR1(CD71)^[9], ESCs 的表面标志物 ERBB4、GTT1 和 ZDHHC13^[10],还需进一步开展功能学研究进行验证。此外,也发现了干细胞分化过程中的特异性标志物,如分化为心肌细胞的阶段特异性标志物 DAB2 等^[11-12]。

2.2 微生物学安全性

干细胞产品的微生物安全性检测包括无菌检查、细菌内毒素检查/热原检查、异常毒性检查、支原体检查和外源病毒因子检查。应采用 2020 年版《中华人民共和国药典》进行无菌检查法检测细菌和真菌,凝胶限度试验检查细菌内毒素,热原检查法检查包括非细菌来源内毒素在内的热原,支原体检查法检测可能的支原体污染。对于使用复制缺陷型等病毒载体获得的干细胞产品,应充分考虑控制病毒载体回复突变的风险。

干细胞终产品及新鲜干细胞制剂的放行检测采用快速检验方法,如 PCR 方法进行无菌检查和支原体检查,但同时需开展药典传统方法的平行检测,并要求对检测结果后期可能出现的非预期结果制定处置方案。

由于干细胞产品生产中采用的原材料和细胞基质等可能带来其他外源病毒因子,以及在生产过程中引入病毒污染,因此对外源病毒因子的控制和检测也非常重要,主要采用细胞培养法、免疫荧光法和 PCR 方法等。体外指示细胞培养法和动物体内接种法为经典的外源病毒因子检测方法,可检测具有感染能力的病毒,其缺点是耗时长,且某些病毒尚没有合适的动物模型,病毒阳性不能直接判定病毒种属,需进一步鉴别。采用 PCR 技术检测干细胞产品中是否存在外源病毒具有快速灵敏的特点,主要针对在干细胞产品制备过程中可能引进的已知病毒,但检出核酸

并不代表病毒具有感染能力。此外,二代测序(next generation sequencing, NGS)技术与上述2种方法比较,比细胞培养法和动物体内接种法快速,但比PCR法繁琐,NGS技术有潜在的优势,即理论上可以检测细胞污染的所有病毒,尤其是未知病毒。研究显示采用NGS技术可以检测牛血清样品中普遍存在的牛源病毒核酸以及新的牛细小病毒^[13]。但NGS的流程比较复杂,涵盖试验的设计、实施和质控,对病毒检出的灵敏度和特异性有较大的影响,目前处于早期的研究阶段,因此NGS技术应用于干细胞制品的安全性检测还需大量的研究工作。

2.3 生物学安全性

干细胞治疗产品的安全性评价应遵从《药物非临床试验质量管理规范》(GLP),主要考察成瘤性和致瘤性。按照2020年版《中华人民共和国药典》进行体内成瘤性和致瘤性检查,软琼脂克隆形成试验和端粒酶活性检测可一定程度上用于评价干细胞产品的成瘤性。在动物致瘤性试验不能有效判断致瘤性时,可同时开展体外试验方法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、基因组稳定性、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、对凋亡诱导敏感性等的影响,间接判断干细胞恶性转化的可能性^[14]。对于ESCs和iPSCs来源的干细胞衍生产品应特别关注终产品的成瘤性和致瘤性检测。

目前,普遍认为MSCs“不致癌”或具有“弱致瘤性”,但不排除其对已存在肿瘤的“促瘤性”作用^[15]。研究显示非突变的宿主细胞与肿瘤细胞之间存在复杂的双向作用,MSCs也具有类似作用。在健康组织, MSCs在创伤愈合和免疫调控方面发挥重要作用^[16];在骨髓微环境中, MSCs通过分泌细胞因子在维持造血干细胞干性和谱系分化中起着重要作用,并有利于维持骨髓造血微环境^[17];在肿瘤微环境中, MSCs通过与肿瘤细胞和微环境其他的成分直接作用,可导致肿瘤发展和转移^[18-19]。因此,干细胞对哪类肿瘤具有促进作用,应用MSCs可以治疗哪些肿瘤,如何评价MSCs在临床应用中对肿瘤的双面性,还需结合临床治疗效果并开展深入的研究工作,建议根据干细胞制剂的组织来源和临床适应症的不同,设计相应的试验方法,以判断其制剂的“促瘤性”。

干细胞产品在体外操作过程中可能分化为非目的细胞,即非预期分化,包括非靶细胞分化或非靶部

位分化,应在体内动物试验中进行研究,并考虑与高通量测序技术等结合进行评估和检测。脱靶编辑主要发生在基因修饰的干细胞产品,可能会出现非目的基因组编辑的风险,如DNA插入或删除等,可采用全基因组测序方法进行分析 and 评估。

2.4 生物学有效性

不同类型的干细胞产品具有不同的生物学功能,需基于产品与临床相关的治疗活性或预期的生物学效应,选择能够代表产品作用机制的生物学有效性测定方法。通过检测干细胞分化潜能、诱导分化细胞的结构和生理功能、对免疫细胞的调节能力、分泌特定细胞因子、表达特定基因和蛋白等功能,来判断干细胞制剂与治疗相关的生物学有效性。ESCs和iPSCs衍生细胞的生物学活性是基于分化细胞特殊的生物学功能的检测,或与分化细胞功能相关的特定基因和蛋白质的检测。另外,干细胞生物学活性检测可能还涉及到细胞定向分化效率检测、细胞及细胞外基质/结构的形成、细胞相互作用(如免疫激活或抑制)、细胞的迁移分化或自我更新潜能评估等。

2.4.1 干细胞分化能力 MSCs应具有成骨分化、成软骨分化和成脂分化能力,但三分化能力的质量标准还需进一步完善。2015年《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》中提到“对间充质干细胞,无论何种来源,应进行体外多种类型细胞(如成脂肪细胞、成软骨细胞、成骨细胞等)分化能力的检测,以判断其细胞分化的多能性。”深圳市细胞治疗技术协会2018颁布的团体标准《临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范》^[20]中对MSCs的分化能力的质量标准做出了具体的规定,即成骨分化染色面积占总面积比例应 $\geq 50\%$;成软骨分化染色面积占总面积比例应 $\geq 80\%$;成脂分化染色面积占总面积的比例 $\geq 50\%$ 。不同组织来源的MSCs因其制备工艺不同,培养条件差异,细胞传代次数等具有的分化能力也存在不同,因此是否可以建立一个最低标准适用于所有的MSCs产品,或根据企业自身的干细胞产品建立特定的质量标准,还需进一步讨论。建立标准方法是建立质量标准的首要条件,目前商品化的分化检测试剂盒品种繁多,尽管检测原理大致相同,但所含成分不尽相同,因此MSCs三分化还需进一步开展质量研究工作,以便制定通用的质量标准。

对未分化的ESCs和iPSCs,须通过体外拟胚胎体形成能力,或在SCID鼠体内形成畸胎瘤的能力,

检测其分化的多能性。

2.4.2 异常免疫学反应 旨在检测干细胞制剂可能引起的异常免疫学反应,通过体外试验及动物试验评价,如异体来源的干细胞制剂、经体外传代培养和特殊处理的自体来源的干细胞制剂等。此外,异体来源的 ESCs 及 iPSCs 在体外诱导分化后重新表达供体的 HLA 抗原分子,植入体内后可能产生免疫排斥反应,需进行体内试验加以评价。目前,体外试验主要包括干细胞对总淋巴细胞增殖抑制、对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响、以及对相关细胞因子分泌的影响等^[21]。干细胞治疗所导致的异常免疫学反应机制比较复杂,需要在临床前研究和临床研究中不断积累数据,进而拓展至体外试验评价指标。

2.4.3 干细胞免疫调控能力 干细胞免疫调控能力主要通过免疫调控因子的表达水平进行评价,可采用流式细胞术、ELISA、ELISpot 等方法。如体外试验检测干细胞免疫调控能力可通过淋巴细胞共培养方法,检测免疫调控因子,例如 MSCs 免疫调控能力常检测促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 及抗炎因子 TGF- β 和 IL-10^[22]。干细胞治疗免疫性疾病和眼科疾病主要通过调节患者的免疫系统发挥作用,重建患者的免疫平衡,进而减轻疾病症状,改善预后。如自身免疫性疾病是一类由免疫系统异常攻击自身组织引起的疾病,包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等^[23]。研究显示 MSCs 通过与调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 和单核细胞相互作用发挥免疫调控作用^[24];脂肪来源的 MSCs 比骨髓来源的 MSCs 具有更强的免疫调控作用^[25];脐带血来源的 MSCs 则在体内给药时引发同种异体免疫反应的风险最小^[26-27]。

基于干细胞产品与临床相关的治疗活性或预期的生物学效应,还需开发干细胞生物学活性的替代指标的分析测定法,应开展此分析测定法与活性的相关性研究,并进行充分的方法学验证,如评估产品的免疫化学、生物化学和分子属性等特征。

2.5 其他常规检测项目

2.5.1 常规理化检测项目 包括外观、pH、装量、可见异物、不溶性微粒、渗透压摩尔浓度、辅料含量等,需符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相应的规定。

2.5.2 纯度和杂质分析 干细胞纯度分析包括活细胞比例、细胞群或亚群比例、目的细胞比例和非目的细胞比例等。采用流式细胞术对上述指标进行检测。对 ESCs 或 iPSCs 来源的干细胞产品需进行杂质分

析,如诱导试剂、病毒载体残留等。

2.5.3 稳定性研究 传代稳定性的研究项目一般包括细胞形态、STR 鉴别、活率、活细胞数、群体倍增时间、表型等生长特性稳定性,也包括染色体核型和组学测序等遗传稳定性,还包括多能性基因表达、畸胎瘤形成、定向诱导分化等干性的稳定性。

3 干细胞产品质量研究进展

开展干细胞产品质量研究对于评价干细胞产品的安全性和有效性具有重要意义。在干细胞质量研究方面,已经取得了一系列令人瞩目的成果,如干细胞培养基的优化、干细胞表面标志物、诱导分化功能、免疫学调控功能等。干细胞产品在临床治疗中针对不同的临床适应症会产生特定的生物标志物,因此质量研究贯穿着干细胞产品的始终,也提示针对干细胞产品的质量标准在满足 2020 年版《中华人民共和国药典》的基础上,对不同来源的产品或不同的适应症可建立适用的特定质量标准,如中国细胞生物学会发布的一系列干细胞的团体标准,包括《人胚干细胞》《人诱导多能干细胞》《人间充质干细胞》,深圳市细胞治疗技术协会团体标准《临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范》等。

3.1 基因修饰干细胞产品的质量控制与质量研究

基因修饰技术使得细胞治疗领域更为复杂,该技术可以实现对干细胞的精准调控,从而增强其治疗特定疾病的能力,如 *NRG1* 基因修饰的骨髓基质干细胞修复脊髓损伤^[28]、*TRAIL* 基因修饰 MSCs 治疗多种恶性肿瘤等^[29]。基因修饰细胞治疗产品既有细胞治疗的特点,也有基因治疗的潜在风险,因此干细胞基因修饰产品的质量控制需在干细胞基本指导原则的基础上,同时参考基因治疗产品的指导原则。结合 2020 年版《中华人民共和国药典》三部收载的〈人用基因治疗制品总论〉,并参考 EMA 于 2021 年 4 月发布了《含基因修饰细胞药品的质量、非临床和临床研究指南》^[30]、CDE 于 2021 年 12 月发布的《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》及 CDE 2022 年 5 月发布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》,上述指导原则对于规范基因修饰类细胞治疗产品的质量具有重要的指导作用。

3.2 干细胞来源功能细胞的质量研究的评价方法

人胚干细胞来源的视网膜色素上皮细胞 (hESC-RPEs) 可用于治疗视网膜变性相关的疾病,如黄斑变性、色素性视网膜炎、Stargardt 病(黄斑萎缩性损害

合并视网膜黄色斑点沉着)等。国内学者对 hESC-RPEs 的质量属性进行了详细的研究,并建立了质量控制评价体系^[31]。提示干细胞来源的功能细胞应用于临床前需根据其功能属性建立质量控制方法及评价体系,保证细胞制品质量可控。

3.3 干细胞来源外泌体相关质量研究

干细胞来源的外泌体可应用于多种疾病的治疗,如骨折、早发性卵巢功能不全、脊髓损伤等^[32],已有多项临床研究治疗不同疾病,包括急性呼吸窘迫综合征、肾脏疾病、移植物抗宿主疾病、关节炎、中风、阿尔兹海默、I 型糖尿病等^[33]。研究显示不同来源的 MSCs 产生的外泌体(MSC-Exos)对疾病的疗效不同^[34]。干细胞来源的外泌体的质量控制在满足干细胞质量控制要求的基础上,可以参考 2018 年国际外泌体协会制定的 MISEV2018 指南(Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018),包括外泌体的分离纯化、定量、蛋白成分分析、标志物及生物学功能研究等方面;此外,我国于 2023 年和 2024 年发布了 2 个行业标准,即上海市生物医药行业协会制定的《间充质干细胞外泌体质量控制标准》和中国食品药品企业质量安全促进会制定的《人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范》。鉴于干细胞来源的外泌体几乎具备了干细胞所有的生物学功能,而且可避免细胞治疗导致的肺微血管物理性栓塞^[35],有替代细胞治疗的潜能,而且通过基因修饰干细胞获得的外泌体药物可靶向特定组织^[36]。

4 前景与展望

由于干细胞产品具有多样性、异质性、复杂性、特殊性、进展性等特性,因此对干细胞产品的质量研究应全面且持续开展,合理选择先进仪器和先进技术,建立简单易行且经济有效的方法。在提高干细胞产品质量方面,可考虑从以下几方面加强:①部分检测项目缺乏质量标准,如 MSCs 的三分化试验等;②无菌 PCR 快检可以用于干细胞产品无菌检测快速放行,但若结果为阳性需要采用药典方法进一步确认,还需建立新鲜细胞制剂无菌快速检测更为可靠的新方法;③不同来源的干细胞产品免疫学调控的相关因子需进一步研究;④建立干细胞来源的功能细胞的质量标准;⑤干细胞产品中相关杂质包括非目的细胞、细胞非预期表达的产物、死细胞残留、细胞碎片和其他可能的降解产物等,因此需进一步开发干细胞产品杂质分析的检测方法,如质谱技术等;⑥考虑将 NGS 技

术与经典检测方法有机结合,开发其在质量控制中的应用;⑦来源于不同个体的干细胞规模化生产的批次差异还需进一步研究,如不同人的脐带组织等。

随着科技的进步,新技术新方法的不断开发,干细胞产品的质量控制一定会越来越完善。在借鉴其他国家先进经验的同时,应加强与国内的科研单位密切合作,对国内原创性成果积极采纳并进行方法学开发和验证,可突破现有的监管思维模式,尽快促进其转化和应用。总体来说,干细胞研究需要结合大量的临床前和临床研究进行全面评价,保障这些产品安全、有效和质量可控,基于干细胞的治疗手段将为更多难治性疾病的患者带来希望。

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
- [2] 李佳璐,何斌,汤红明,等.全球干细胞临床研究现状与展望[J].海南医学,2024,35(7):1044
- [3] LI JL, HE B, TANG HM, et al. Current status and prospects of global stem cell clinical research[J]. Hainan Med J, 2024, 35(7): 1044
- [4] TOKUNAGA K, SAITOH N, GOLDBERG IG, et al. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells[J]. Sci Rep, 2014, 4(1): 6996
- [5] HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313
- [6] MORALLI D, YUSUF M, MANDEGAR MA, et al. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells[J]. Stem Cell Rev Rep, 2010, 7(2): 471
- [7] SEO JH, CHO SR. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials[J]. Yonsei Med J, 2012, 53(6): 1059
- [8] CALLONI R, CORDERO EAA, HENRIQUES JAP, et al. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(9): 1455
- [9] ZHAO W, JI X, ZHANG F, et al. Embryonic stem cell markers[J]. Molecules, 2012, 17(6): 6196
- [10] PRIPUZOVA NS, GETIE-KEBTIE M, GRUNSEICH C, et al. Development of a protein marker panel for characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using global quantitative proteome analysis[J]. Stem Cell Res, 2015, 14(3): 323
- [11] SHEKARI F, NEZARI H, LARIJANI MR, et al. Proteome analysis of human embryonic stem cells organelles[J]. J Proteomics, 2017, 162: 108
- [12] HOFSTEEN P, ROBITAILLE AM, CHAPMAN DP, et al. Quantitative proteomics identify DAB2 as a cardiac developmental regulator that inhibits WNT/ β -catenin signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,

- 2016, 113(4): 1002
- [12] MEYFOUR A, PAHLAVAN S, MIRZAEI M, *et al.* The quest of cell surface markers for stem cell therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 78(2): 469
- [13] ONIONS D, KOLMAN J. Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents [J]. *Biologicals*, 2010, 38(3): 377
- [14] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行) [S]. 2015 Guiding Principles for Quality Control and Preclinical Study of Stem Cell Preparations (Trial) [S]. 2015
- [15] ZHUANG WZ, LIN YH, SU LJ, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 28
- [16] KIDD S, SPAETH E, DEMBINSKI JL, *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using *in vivo* bioluminescent imaging [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10): 2614
- [17] CRIPPA S, BERNARDO ME. Mesenchymal stromal cells: role in the BM niche and in the support of hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Hemasphere*, 2018, 2(6): e151
- [18] ATIYA H, FRISBIE L, PRESSIMONE C, *et al.* Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 12(34): 31
- [19] FRISBIE L, BUCKANOVICH RJ, COFFMAN L. Carcinoma-associated mesenchymal stem/stromal cells: architects of the pro-tumorigenic tumor microenvironment [J]. *Stem Cells*, 2022, 40(8): 705
- [20] 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范 [S]. 2018: 1 Product Specification of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell for Clinical Research [S]. 2018: 1
- [21] 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
- HAN XY, NA T, ZHANG KH, *et al.* Quality evaluation for biological effectiveness of human mesenchymal stem cells [J]. *Chin J New Drugs*, 2018, 27(21): 2511
- [22] 张郭, 汪振星, 孙家明. 人脂肪来源干细胞的免疫调控及其临床应用 [J]. *现代免疫学*, 2022, 42(5): 427
- ZHANG G, WANG ZX, SUN JM. Immunomodulation and clinical applications of human adipose-derived stem cells [J]. *Curr Immunol*, 2022, 42(5): 427
- [23] MUNIR H, MCGETTRICK HM. Mesenchymal stem cell therapy for autoimmune disease: risks and rewards [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(18): 2091
- [24] WEISS ARR, DAHLKE MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1191
- [25] MELIEF SM, GEUTSKENS SB, FIBBE WE, *et al.* Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6 [J]. *Haematologica*, 2013, 98(6): 888
- [26] KIM JH, JO CH, KIM HR, *et al.* Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells from the periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 8429042
- [27] SONG N, SCHOLTEMEIJER M, SHAH K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(9): 653
- [28] 符禹玄, 陈君, 赵富生, 等. *NRG1* 基因修饰的骨髓基质横切损伤的修复作用及其机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(2): 204
- FU YX, CHEN J, ZHAO FS, *et al.* Effect and mechanism of transplantation bone marrow stromal stem cells transfected *NRG1* gene on repair of hemi-transected spinal cord injury in rats [J]. *Med J Chin PLA*, 2024, 49(2): 204
- [29] 张晨亮, 李欣, 米一, 等. 基因修饰间充质干细胞治疗肿瘤研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(10): 2049
- ZHANG CL, LI X, MI Y, *et al.* Research progress of genetically modified mesenchymal stem cells in treatment of tumors [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(10): 2049
- [30] European Medicines Agency. Quality, Non-clinical and Clinical Aspects of Medicinal Products Containing Genetically Modified Cells [EB/OL]. (2021-06-01) [2025-01-08]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells-scientific-guideline>
- [31] 纳涛, 王磊, 郝捷, 等. 人胚胎干细胞来源的视网膜色素上皮细胞质量控制研究 [J]. *生命科学*, 2018, 30(3): 248
- NA T, WANG L, HAO J, *et al.* The quality control studies on human embryonic stem cells-derived retinal pigment epithelial cells [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2018, 30(3): 248
- [32] 王聪, 周建政. 间充质干细胞来源的外泌体治疗早发性卵巢功能不全的研究进展 [J]. *中国性科学*, 2024, 33(7): 35
- WANG C, ZHOU JZ. Research progress of exosomes derived from mesenchymal stem cells in treatment of premature ovarian insufficiency [J]. *Chin J Hum Sexual*, 2024, 33(7): 35
- [33] LOTFY A, ABOQUELLA NM, WANG H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 66
- [34] BÖRGER V, BREMER M, FERRER-TUR R, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1450
- [35] LIEW LC, KATSUDA T, GAILHOUSE L, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease [J]. *Int Immunol*, 2017, 29(1): 11
- [36] WANG R, XU B. TGFβ1-modified MSC-derived exosome attenuates osteoarthritis by inhibiting PDGF-BB secretion and H-type vessel activity in the subchondral bone [J]. *Acta Histochem*, 2022, 124(7): 151933

(本文于 2024 年 12 月 2 日收到)