

干细胞制备过程中伦理风险的系统性综述^{*}

李欣^① 陆东哲^① 张懿中^① 吴朝晖^②
李昂^② 王晓熙^② 薛迪^① 周萍^①



摘要:通过检索国内外 6 个文献数据库以获取 2010 年 1 月~2020 年 7 月干细胞制备伦理风险的文献,并对不同类型干细胞制备过程中存在的伦理风险进行系统性综述。对 64 篇与干细胞制备伦理风险相关的纳入文献进行分析后发现,干细胞制备过程的伦理风险不仅涉及生物材料供体和组织来源的选择,还涉及干细胞制备各个环节的安全性。鉴于目前干细胞的制备技术尚未成熟,建议干细胞制备过程中应严格控制生物材料供体和组织来源,不断改进制备工艺,控制制备过程质量,以确保人体移植的安全性。

关键词:干细胞, 制备, 伦理风险

中图分类号:R-05 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-0772(2022)10-0010-03

DOI:10.12014/j.issn.1002-0772.2022.10.03

Systematic Review of Ethical Risks in Stem Cell Preparation LI Xin, LU Dong-zhe, ZHANG Yi-zhong, et al. School of Public Health, Fudan University/Key Lab of Health Technology Assessment, National Health Commission (Fudan University), Shanghai 200032, China

Abstract:Six literature databases in China and abroad were searched to obtain the relevant literatures published from January 2010 to July 2020, and a systematic review was conducted to analyze the ethical risks in preparation of different types of stem cells. After analyzing 64 included literatures relevant to ethical risks of stem cell preparation, the study found that the ethical risks of stem cell preparation not only involved the selection of biomaterial providers and tissue sources, but also involved the safety of each process of stem cell preparation. Due to the immature technology of stem cell preparation at present, the authors suggested that in order to ensure the safety of human transplantation, biomaterial providers and tissue sources should be strictly selected in the process of stem cell preparation, the technology of stem cell preparation should be continuously improved, and the quality of stem cell preparation should be strictly controlled.

Key Words:stem cell, preparation, ethical risk

与一般的生物制品不同,干细胞来源于活的生物体组织,其生产制备过程包括干细胞采集、组织分离、原代细胞的培养与纯化、细胞扩增、冻存、运输等复杂程序。确保细胞活性、生物功能稳定性、遗传稳定性和质量可控性,关系到干细胞临床应用的安全性和有效性^[1]。本文通过系统性综述,分析不同类型干细胞(主要是间充质干细胞)制备过程中的伦理问题,为干细胞大规模生产的质量控制、干细胞产品临床应用的安全性评估和干细胞生产制备技术的不断完善提供参考依据。

1 资料来源

本研究通过国内外的 6 个主要文献数据库(中国生物医学文献数据库、中国知网、万方、PubMed、Ovid-EMBASE、Cochrane Library)的相关文献检索,根据文献的纳入和排除标准,获得 2010 年 1 月~2020 年 7 月发表的涉及干细胞制备伦理风险的相关文献。具体文献筛选过程见《干细胞生物材料来源及其伦理风险的系统性综述》一文^[2]。

2 结果

2.1 涉及干细胞制备过程中伦理风险的文献分析

64 篇纳入分析的涉及干细胞制备过程中伦理风险的文献中,发表文献较多的年份为 2011 年~2015 年,占有文献的 64.06%;第一作者所在国家主要来自中国(占 89.06%);文献类型主要是评述或一般综述类(占 59.37%),原始研究和学位论文均占 17.19%。见表 1~表 3。

2.2 间充质干细胞制备过程中的伦理问题

2.2.1 供者和组织来源的选择

不同供者来源的间充质干细胞(mesenchymal stem

^{*} 基金项目:2020 年中国医药生物技术协会项目(2020002);2016 年国家重点研发计划“干细胞转化研究”重点专项(2016YFA0101300)

^① 复旦大学公共卫生学院/国家卫生健康委员会卫生技术评估重点实验室(复旦大学) 上海 200032

^② 中国医药生物技术协会 北京 100022

作者简介:李欣(1997-),女,硕士研究生,研究方向:社会医学与卫生事业管理。

通信作者:周萍(1982-),女,博士,副教授,研究方向:医院管理、卫生技术评估、生命伦理学等。E-mail:zhouping@fudan.edu.cn

cells, MSCs), 其增长率、分化能力、染色体稳定性、植入机体后的活性等有所差异。一般来说, 供者年龄较大的 MSCs 老化较快, 其生物学活性也会变差, 从而使诱导成功率降低, 如随着年龄的增长, 骨髓数量显著减少, MSCs 的增殖及分化能力变弱^[3]。不同细胞来源和培养方式, 细胞携带传染性疾病的风险和传染的后果不同。供者携带隐性遗传病的异常染色体, 由于其缺乏可供检测的细胞表型, 增加了受者引入相关遗传疾病的风险^[4]。此外, 不同组织源性的 MSCs 受特定基因表达的影响, 其表面特征和功能也会有所不同, 有必要根据其组织来源进行选择^[5]。

表 1 干细胞制备过程中伦理风险的文献发表年份

文献发表年份	文献数	百分比/%
2010 年	4	6.25
2011 年	7	10.94
2012 年	8	12.50
2013 年	10	15.62
2014 年	7	10.94
2015 年	9	14.06
2016 年	4	6.25
2017 年	4	6.25
2018 年	5	7.81
2019 年	4	6.25
2020 年	2	3.13
合计	64	100.00

表 2 干细胞制备过程中伦理风险的文献作者国别

第一作者所在国家	文献数	百分比/%
中国	57	89.06
其他	7	10.94
合计	64	100.00

表 3 干细胞制备过程中伦理风险的文献类型

文献类型	文献数	百分比/%
原始研究	11	17.19
系统性综述	4	6.25
学位论文	11	17.19
评述或一般综述	38	59.37
合计	64	100.00

2.2.2 鉴定、分离、纯化

目前, MSCs 鉴定、分离、纯化的难度仍较大, 而难以找到特异性的表面标记使 MSCs 鉴定困难。MSCs 分离方法有多种, 包括贴壁培养法、免疫磁珠法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法等, 每种方法都有不足之处。如贴壁培养法获得的 MSCs 纯度不够高, 免疫磁珠法和流式细胞仪分选法价格高昂, 且会损伤细胞而影响存活率。因此, MSCs 分离需要多种方法结合使用。MSCs 的定向分化对分化微环境有严格要求, 但有时取自供者不同组织的 MSCs 不能分化为目标细胞(targeted cells)而分化为其他细胞, 可控性不够高^[5]。MSCs 的鉴定、分离、纯化问题对干细胞制备过程中的安全性和效果构成了挑战。

2.2.3 添加物使用

MSCs 培养过程中需要使用血清、抗生素、诱导剂等

添加物, 这些可能成为 MSCs 体外培养过程中外源性污染的来源。胎牛血清属异种蛋白, 可能含有动物携带的细菌、病毒、感染性蛋白质、朊病毒、生长因子及多种成分不明的促细胞分化因子, 且不同批次间的胎牛血清高度变异, 组成成分尚不十分清楚。针对胎牛血清存在的诸多弊端, 越来越多的研究开始探索使用无动物性成分的添加剂(如血小板裂解液、富血小板血浆、人血清、人脐血清等)替代胎牛血清, 但这些添加剂也存在缺陷, 如血液来源有限、血小板裂解液扩增的 MSCs 在临床应用于免疫调节剂方面具有局限性、人血清中可能含有病原体等^[6]。

干细胞制剂在应用之前需要冷藏, 而常用的冷冻保护剂二甲基亚砜具有潜在的毒性, 特别在高于 4℃ 的温度下, 可致基因型改变、分化潜能受损, 对受者产生副作用(如恶心、呕吐, 甚至死亡)^[7-8]。

2.2.4 永生化、表型改变和致瘤性问题

干细胞的多次传代会使干细胞的生物学特性发生改变, 如老化、多向分化潜能退化、分泌能力降低, 甚至出现永生化倾向或癌变能力。如随着培养代数的增加, 骨髓 MSCs 表面标志物逐渐丢失, 第 9 代已检测不到标志物; 也有发现骨髓 MSCs 长期体外扩增培养后, 可能突破寿命调控而呈现出永生化倾向^[9]。MSCs 经体外培养、传代后, 可能出现染色体变异, 虽然目前尚未证实染色体的异常改变与致瘤性相关, 但这种改变提示了培养环境可导致遗传不稳定性发生, 遗传不稳定性则是细胞癌变的重要生物学基础之一^[10]。脐带 MSCs 也可能存在异常的染色体核型。此外, 经体外培养的 MSCs 在特定的微环境下(如低氧、化学物质诱导、生物因素等)可能发生恶变, 生物因素会影响 MSCs 的增殖、分化和促进恶性转化^[5]。

MSCs 的致瘤性仍存在诸多争议, 有学者认为 MSCs 移植前进行了广泛的体外扩增增加了基因突变的风险, 最终导致恶性转化; 但是也有学者认为体外扩增出现的恶变是由于在实验室中使用的细胞株的交叉污染导致^[11]。

2.3 人胚胎干细胞制备过程中的伦理问题

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)制备过程的伦理问题包括: (1) 衍生过程中使用动物培养基或滋养细胞(feeder cells)成分有传播感染和异种抗原的风险; (2) 经体外培养后, 容易发生遗传和表观遗传性状的改变, 也观察到一些印记基因的表达发生改变^[12], 还可能发生染色体拷贝数的改变及杂合丢失^[10]; (3) 在培养中可能表现出基因组不稳定性 and 无法预判的分化结果, 导致下一代出现某些生理缺陷; (4) 疾病不能通过植入前遗传诊断识别, 因此仅能建立罕见的单基因突变或单染色体畸变的疾病特异性 hESCs; (5) hESCs 的定向诱导分化仍存在挑战, 不同的 hESCs 发育潜力不同; (6) 由 hESCs 分化得来的多巴胺能神经元可能存在质量问题; (7) 体外长期培养是影响 hESCs 和人孤雌

胚胎干细胞临床应用安全性的首要因素。

2.4 其他干细胞制备过程中的伦理问题

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是神经外胚层细胞系的多能干细胞,形成过程中可能出现细胞变异,包括突变、表观遗传重组异常、X 染色体失活、拷贝数异常、DNA 碱基的改变、出现免疫原性等^[13]。

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)的增殖能力较强,具有多向分化潜能,但是脂肪组织含量有限,并且在制备过程中也存在一些亟待解决的问题。如 ADSCs 缺乏特异性的表面标志物,分离纯化困难;定向多向分化的机制目前尚不清楚,体内外诱导机制还未成熟和完善^[14];ADSCs 长期体外培养的安全性问题仍未获得准确评估和保障,可能引发自发的恶性转化^[15]。

骨髓干细胞(bone marrow derived stroma cells, BMSCs)是重要的肝外肝细胞来源,但是 BMSCs 分化过程存在癌变和促纤维化的风险,且 BMSCs 向肝细胞转化的过程非常缓慢^[16]。

近年来,精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)的研究也取得一定的突破,但是 SSCs 数量极少,组织来源有限,若患者缺乏 SSCs,则难以获取 SSCs 用于治疗不育;SSCs 稳定性低,且各批次间差异大,不具备高重复性,因此 SSCs 富集和保存难度均较大;针对 SSCs 表面标志物和分化抗原特征的研究仍未取得进展,因而获得高纯度的 SSCs 十分困难。虽然目前已经实现了人 SSCs 的体外增殖培养,但培养难度较大,SSCs 在长期培养过程中会发生表型改变,并且尚未实现人 SSCs 在体外诱导分化形成精子,离临床应用还很遥远^[17]。

3 讨论

3.1 人类对干细胞制备过程的认识尚处在发展阶段

现阶段,干细胞制备过程仍存在许多亟待完善的方面。不同供者来源的干细胞分化能力、生物学活性、老化速度等存在较大差异,因此在制备过程中应该严格选择干细胞来源生物材料的供者,特别是供者需进行严格体检,充分了解供者遗传背景和既往病史,确定是否有遗传病以及健康状况是否符合要求等,尽量排除可能对干细胞受者产生不良影响的因素,如人体免疫缺陷病毒、人类 T 淋巴细胞病毒等^[5]。干细胞的制备技术尚未成熟,干细胞的鉴定、分离、纯化仍存在很大挑战,非目的性分化、无功能性分化、不能有效扩增等问题亟待解决,体内外诱导机制仍未完善,这些都阻碍了干细胞临床应用的进展。

3.2 制备安全性是临床应用伦理关注的重要方面

干细胞制备的安全性问题涉及多个方面,包括外源性微生物污染、异种蛋白引入;批次之间产品的稳定性差;多次传代后干细胞的生物学特性改变,出现老化、多向分化潜能退化、分泌能力降低,甚至出现永生化倾向;经体外长期培养还会出现染色体变异,特定的微环境也可能影响干细胞的增殖、分化和促进恶性转化等。干细

胞制备的安全性是影响干细胞大规模临床应用的重要原因,也是干细胞临床应用伦理关注的重要方面。

3.3 干细胞制备过程需严格控制质量,不断改进工艺

不同于传统的药物,干细胞制剂的制备技术具有多样性、复杂性和特殊性。为了确保干细胞制剂临床应用的安全性和有效性,需要对干细胞的采集和分离、干细胞系的建立、干细胞制剂制备的整个过程进行质量监控^[18]。此外,还需继续改进制备工艺,尽可能使用无动物源性成分的添加物或使用无血清的培养基,减少添加物残留量,降低微生物污染的风险;在干细胞产品用于临床治疗之前,对长时间扩增过程中的干细胞进行安全性评估,了解基因组及表观遗传稳定性的相关因子是否发生变化,确保人体移植的安全性。

参考文献

- [1] 耿洁,张磊,韩之波,等. 临床用间充质干细胞的质量控制研究[J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(3): 225-230.
- [2] 陆东哲,李欣,吴朝晖,等. 干细胞生物材料来源及其伦理风险的系统性综述[J]. 医学与哲学, 2022, 43(8): 20-23.
- [3] 卫沛. 间充质干细胞生产流程中的质量控制和微生物污染风险的防控[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [4] 闫守泉. 干细胞实验研究中的生物安全风险及其防控对策[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(16): 158.
- [5] 范宏杰,刘利龙,黄建强,等. 间充质干细胞的临床应用若干问题[J]. 东南国防医药, 2017, 19(3): 285-289.
- [6] 吴迪,武晓云,吴岩. 无动物源性成分培养基体外扩增的间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28): 4583-4587.
- [7] ZANATA F, SHAIK S, DEVIREDDY R V, et al. Cryopreserved Adipose Tissue-derived Stromal/Stem Cells: Potential for Applications in Clinic and Therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 951: 137-146.
- [8] KAMAL M M, KASSEM D H. Therapeutic Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Diabetes: Achievements and Challenges[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 16.
- [9] 胡宜,程鹏,刘云会. 骨髓间充质干细胞应用的风险: 促瘤及成瘤性[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(5): 492-495.
- [10] 袁宝珠. 治疗性干细胞产品的相关风险因素[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(5): 736-739.
- [11] 陈榕,江涛,杨爱珍,等. 人脐带间充质干细胞应用于肝移植患者的观察[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(17): 2665-2671.
- [12] 郭丽媛. 不同氧浓度下人孤雌胚胎干细胞基因组印迹的初步研究[D]. 广州: 广州医学院, 2012.
- [13] 涂雪松. 神经干细胞移植后安全性及预防措施的基础研究[J]. 中国临床神经科学, 2013, 21(6): 708-712.
- [14] 刘元媛. Choukroun's PRF 对体外培养人脂肪干细胞增殖及成骨分化影响的实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [15] 邹雅琴,张培华. 体外扩增和纯化脂肪干细胞应用于自体脂肪移植的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(22): 3754-3756.
- [16] 袁璐萍. 自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2011, 13(11): 1279-1281.
- [17] 邓存灿,刘贵华. 干细胞疗法在治疗非梗阻性无精子症中的应用[J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(4): 351-356.
- [18] 马洁,刘彩霞,谭琴,等. 细胞产品质量控制与质量管理[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 273-292.

收稿日期: 2021-12-11

修回日期: 2022-04-12

(本文编辑: 于磊)