

## 间充质干细胞产品生物学活性检测方法建立\*

王瑶, 房吉庆, 袁子维, 李瑶玲, 杨英\*\*, 饶春明\*\*

(北京昭衍药物检定研究有限公司, 北京 102605)

**摘要 目的:** 建立间充质干细胞(MSCs)生物学活性检测方法,应用于MSCs产品的质量控制。**方法:** 采用流式细胞术检测MSCs表面标志物;采用抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠等诱导MSCs成骨分化,诱导后用茜素红S染色,检测成骨分化能力;采用IBMX、罗格列酮等诱导MSCs成脂分化,诱导后用油红O染色,检测成脂分化能力;采用ITS、TGF- $\beta$ 3等诱导MSCs成软骨分化,诱导后用阿利新蓝染色,检测成软骨分化能力;采用细胞共培养和ELISA方法检测MSCs对巨噬细胞极化的作用,将THP-1细胞诱导为巨噬细胞后与MSCs共培养,ELISA方法检测共培养上清中IL-10、TNF $\alpha$ 表达水平;采用CFSE标记细胞法、CD3/CD28刺激PBMC活化法和细胞共培养方法,用流式细胞术检测MSCs对淋巴细胞增殖抑制的能力。**结果:** 间充质干细胞表面标志物CD105、CD73和CD90表达均 $\geq 95\%$ , CD45、CD34、CD14、CD19和HLA-DR表达 $\leq 2\%$ ; MSCs经成骨诱导分化后显微镜下可观察到红色钙结节;MSCs经成脂诱导分化后显微镜下可见红色的脂质空泡,呈典型的脂质分化;MSCs经软骨诱导分化形成软骨细胞球,显微镜下可见典型的软骨陷窝;MSCs与诱导的THP-1巨噬细胞共培养后, MSCs能刺激IL-10表达增多,并下调TNF $\alpha$ 分泌; MSCs对CD3/CD28活化后的PBMC的增殖具有抑制作用,抑制率为76.4%。**结论:** 本研究建立了MSCs表面标志物、分化能力、促进巨噬细胞极化和淋巴细胞增殖抑制的检测方法,可用于MSCs产品生物学活性检测。

**关键词:** 间充质干细胞;表面标志物;分化;免疫调控;巨噬细胞极化;淋巴细胞增殖抑制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)01-12-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1325

## Research on biological activity methods of mesenchymal stem cell products\*

WANG Yao, FANG Ji-qing, YUAN Zi-wei, LI Yao-ling, YANG Ying\*\*, RAO Chun-ming\*\*

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

**Abstract Objective:** To explore the biological function methods of mesenchymal stem cells(MSCs) for quality analysis. **Methods:** The surface markers of MSCs were detected by flow cytometry. MSCs osteogenic differentiation was induced by ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate sodium, etc., followed by Alizarin Red S staining. MSCs adipogenic differentiation was induced by IBMX, Rosiglitazone, etc., followed by Oil Red O staining. MSCs could differentiate into chondrocytes with treatment of ITS and TGF $\beta$ 3, etc., followed by Alcian Blue staining. Cell co-culture of THP-1-macrophage with MSCs and ELISA assay were applied to detect the effects of MSCs

\* 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 饶春明 Tel: 13601118316; E-mail: raochunming@joinn-lab.com

杨英 Tel: 18202520725; E-mail: yangying@joinn-lab.com

第一作者 Tel: 18702268371; Email: wangyao@joinn-lab.com

on macrophage polarization. The expression levels of IL-10 and TNF  $\alpha$  in the cell co-culture supernatant were detected by ELISA. To observe the effects of MSCs on lymphocyte proliferation, MSCs cultured with PBMCs, which were labeled with CFSE and activated by CD3/CD28, followed by flow cytometry. **Results:** The expression of MSCs surface markers, CD105, CD73, and CD90, was more than 95% respectively, while the expression of CD45, CD34, CD14, CD19, and HLA-DR expression was less than 2%. MSCs osteogenic differentiation assay showed red calcium nodules. Red lipid vacuoles were observed in MSCs adipogenic induction differentiation. Furthermore, MSCs have the differentiation potential to chondrocyte spheroids, and typical cartilage pits were observed. Co-culture of MSCs with THP-1 macrophages, an increase in IL-10 expression and downregulate TNF $\alpha$  secretion were observed. MSCs played inhibitory effects on the proliferation of PBMC activated by CD3/CD28, with an inhibition rate of 76.4%. **Conclusions:** This study established some of biological activity detection methods for MSCs, including MSCs surface markers, differentiation abilities, promotion of macrophage polarization, and inhibitory effects on lymphocyte proliferation. It provides a potential application for MSCs products quality control.

**Keywords:** mesenchymal stem cells; immunologic surface markers; differentiation; immunomodulation; macrophage polarization; lymphocyte proliferation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的多能干细胞,其生物学有效性可归纳为3大类,即诱导分化潜能、免疫调控功能以及组织再生能力<sup>[1]</sup>。因其独特的生物学活性,多项临床试验表明 MSCs 可用于改善多种疾病的症状,如阿尔茨海默病、渐冻症、关节炎、心肌梗死、血液系统疾病等<sup>[2-3]</sup>,针对神经、肝脏、肾脏等多个系统相关的重大疾病均做了有益尝试<sup>[4]</sup>,因此保证干细胞产品安全有效、质量可控对于干细胞产品临床应用尤为重要。

国内外已有多种疾病采用干细胞疗法进行临床研究<sup>[5]</sup>,目前,国际已有19款干细胞产品上市,我国首款干细胞治疗药品-艾米迈托赛注射液(睿铂生)已上市。生物学活性方法建立属于临床前研究阶段,该方法的研究与结果对于预测未来临床阶段的治疗效应提供重要的依据,因此 MSCs 生物学活性是干细胞产品临床转化的重要质量属性<sup>[6]</sup>。研究表明 MSCs 可以定向诱导分化为各种组织细胞,包括心肌细胞、骨细胞、肝细胞、脂肪细胞、软骨细胞、上皮细胞及神经细胞等<sup>[7]</sup>,因 MSCs 的多向分化能力,在组织再生及修复等方面发挥重要作用,例如骨髓来源的 MSCs,具有良好的软骨分化能力,临床上用于治疗膝骨性关节炎等相关疾病<sup>[8]</sup>;脂肪来源的间充质干细胞,利用其良好的内皮分化能力,被用于治疗缺血性疾病等研究<sup>[9]</sup>。MSCs 的免疫调控功能是其治疗各种疾病的重要细胞生物学基础,干细胞的免疫调节作用主要是通过直接接触或旁分泌作用产生多种生长因子、黏附分子、趋化因子

等,与 T 细胞、B 细胞、NK 细胞相互作用<sup>[10]</sup>、抑制 M1 型巨噬细胞的活性并诱导巨噬细胞向 M2 型极化<sup>[11]</sup>、并调控 Th1/Th17/Treg 淋巴细胞亚群的功能等<sup>[12-13]</sup>。基于上述免疫调节功能,干细胞可用于改善心肌梗死后的心脏纤维化和肝纤维化等<sup>[14]</sup>,对类风湿性关节炎、多发性硬化等多种免疫性疾病也具有疗效<sup>[15]</sup>,并在移植后抗宿主疾病方面发挥作用<sup>[16]</sup>。

目前越来越多企业投入干细胞产品的研发,其生产工艺设计与验证、质量研究和质量控制、稳定性研究等研发过程中应遵循药物研发的一般规律<sup>[17]</sup>。成骨、成脂和成软骨细胞的三系分化可作为不同组织来源 MSCs 的质量标准之一<sup>[18]</sup>。而干细胞的免疫调控功能是治疗各种疾病的细胞生物学基础,其调控水平可以预估临床治疗效果。本研究基于干细胞产品相关指导原则,并结合方法学验证的要素,针对 MSCs 生物学活性的质量属性进行了相应的方法建立,包括干细胞表面标志物检测,成骨、成脂、成软骨分化能力检测,促巨噬细胞极化和抑制淋巴细胞增殖能力检测,初步建立了 MSCs 产品质量检测基础技术体系,可用于 MSCs 产品常规生物学活性检测。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

TS2R 显微镜(Nikon 公司),1574-A-GP 生物安全柜(Thermo Fisher 公司),M5 酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司),N7-00007 流式细胞仪(无锡厦泰生物科技有限公司),Sorvall ST8R 离心机(Thermo

Fisher 公司)。

## 1.2 细胞

人脂肪 MSCs(供试品留样,或者购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司)、人外周血淋巴细胞(PBMC,妙顺(上海)生物科技有限公司)、人单核细胞白血病细胞(THP-1,协和细胞中心)。

## 1.3 材料

无血清干细胞培养基购自赛百慷,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司, Trypsin 0.25% EDTA(0.25% 胰酶)购自 Gibco 公司,表面标志物检测试剂盒 hMSC Analysis Kit 购自义翘神州公司,成骨诱导分化试剂盒、成软骨诱导分化试剂盒、成脂诱导分化试剂盒均购自大连美仑生物科技有限公司, CFSE 购自 eBioscience 公司, CD3/CD28 磁珠购自同立海源生物, ELISA 检测试剂盒购自联科生物。

## 2 方法与结果

### 2.1 MSCs 细胞准备

取一瓶正常生长状态下的人脂肪 MSCs,用胰酶 1 mL 进行消化, 300 g 离心 5 min,弃上清后加入细胞培养液 2 mL 重悬细胞,用台盼蓝染色计数。

### 2.2 THP-1 细胞准备

取一瓶生长状态良好的 THP-1 细胞, 300 g 离心

5 min,弃上清后加入细胞培养液 2 mL 重悬细胞,用台盼蓝染色计数,根据实验调整细胞浓度。

### 2.3 流式细胞术检测干细胞表面标志物

将消化后的 MSCs 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$  cells  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 分别加入相应的阳性抗体 CD73、CD90 和 CD105 及阴性抗体混染管(CD45、CD34、CD14、CD19、HLA-DR), 4 °C 避光孵育 30 min,每管用 PBS 1 mL 洗涤 3 次后上机检测,实验分别由同一实验员平行上样 6 次做重复性验证,2 名实验员重复进行检测作为中间精密度,使用 2 批检测试剂作为耐用性验证。应用 GraphPad Prism 进行数据分析,实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm S$ ) 表示,组间比较用独立样本 *t* 检验,以  $\alpha=0.05$  为检验标准,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

实验结果表明干细胞表面标志物 CD73、CD90、CD105 阳性率均  $> 95\%$ , 阴性标志物 CD45、CD34、CD14、CD19、HLA-DR 阳性率  $< 2\%$ ,重复性 ( $n=6$ ) 实验中(实验员 A)的 RSD 均  $< 1\%$ 、中间精密度 ( $n=12$ ) 实验中(2 名实验员比较)的 RSD 均  $< 1\%$ ,耐用性 ( $n=4$ ) 实验中(2 批试剂盒比较)的 RSD 均  $< 10\%$ ,证明实验具有良好的重复性、中间精密度及耐用性,结果见表 1、2。

表 1 流式细胞术检测 MSCs 表面标志物精密度

Tab. 1 Precision of MSCs surface markers by flow cytometry

实验员 (technician)	编号 (No.)	阳性率(positive rate)/%			
		CD73	CD90	CD105	CD45/CD34/CD14/CD19/HLA-DR
A	1	99.88	99.18	99.72	0.37
	2	99.78	99.31	99.79	0.28
	3	99.83	99.49	99.64	0.33
	4	99.87	99.40	99.72	0.29
	5	99.91	99.49	99.72	0.38
	6	99.81	99.49	99.68	0.32
	$\bar{X} \pm S$	99.85 $\pm$ 0.05	99.39 $\pm$ 0.13	99.71 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.04
	RSD/%	0.049	0.13	0.050	N/A
B	1	99.78	99.71	99.58	0.22
	2	99.80	99.77	99.62	0.22
	3	99.83	99.67	99.63	0.2
	4	99.85	99.64	99.67	0.21
	5	99.89	99.80	99.63	0.21
	6	99.77	99.78	99.72	0.17
	$\bar{X} \pm S$	99.82 $\pm$ 0.05	99.73 $\pm$ 0.06	99.64 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.02
	RSD/%	0.046	0.065	0.048	N/A
中间精密度(intermediate precision) $\bar{X} \pm S$		99.83 $\pm$ 0.05	99.56 $\pm$ 0.20	99.68 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.07
RSD/%		0.047	0.20	0.059	N/A

表 2 流式细胞术检测 MSCs 表面标志物耐用性结果

Tab. 2 Durability results of MSCs surface markers by flow cytometry

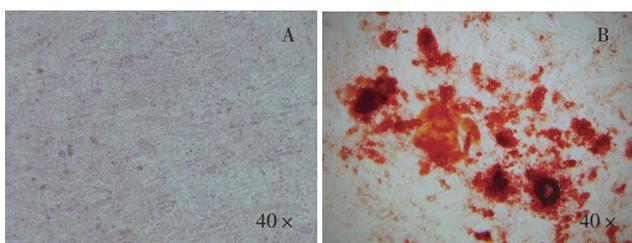
编号 (No.)	阳性率 (positive rate) / %			
	CD73	CD90	CD105	CD45/CD34/CD14/CD19/ HLA-DR
批次 A 1	99.84	99.25	99.94	0.08
(batch A) 2	99.98	99.24	99.98	0.07
批次 B 1	99.86	99.13	99.71	0.13
(batch B) 2	99.82	99.82	99.82	0.48
$\bar{X} \pm S$	99.88 ± 0.07	99.36 ± 0.31	99.86 ± 0.12	0.19 ± 0.20
RSD / %	0.072	0.31	0.12	N/A

注 (note): 批次 A、B 为分别来源同一厂家不同批号的试剂盒 (batch A and B are different batch numbers of reagent kits from the same manufacturer)

### 2.4 成骨诱导分化实验

将 0.1% 明胶 2 mL 加入到 6 孔细胞培养板中, 均匀包被培养板底面, 放置 30 min 后吸弃明胶并于无菌条件下室温晾干。将消化后的 MSCs 按每孔  $2 \times 10^5$  cells 接种于明胶包被的培养板中, 培养 18~24 h, 待细胞融合度达 60%~70% 后加入成骨诱导完全培养基培养 (含基础培养 175 mL、血清 20 mL、抗坏血酸 0.4 mL、 $\beta$ -甘油磷酸钠 2 mL、地塞米松 20  $\mu$ L, 按试剂盒说明进行配制), 每隔 2~3 d 换液, 培养 2~4 周, 结束分化后, 吸弃上清, 每孔用 PBS 2 mL 清洗 2 次, 吸弃 PBS, 加入 4% 多聚甲醛 2 mL 固定 30 min, 用 PBS 2 mL 清洗细胞培养板 2 次, 每孔加入茜素红 1 mL 染色 5~10 min, 吸弃染液, 用 PBS 2 mL 清洗 3 次, 每孔加入 PBS 1 mL, 显微镜下观察。实验设对照组和诱导分化组, 每组双复孔。

MSCs 成骨诱导分化结果见图 1, 成骨诱导分化培养基培养 4 周后, 显微镜下观察, 对照组未观察到钙结节, 实验组发生干细胞分化, 茜素红染色后可见红色钙结节, 提示干细胞具有一定的成骨分化的能力。



A. 对照组 (干细胞培养基培养) [control (MSCs cultured with stem cell culture medium)]

B. 实验组 (诱导分化培养基培养) [experimental group (MSCs cultured with induced differentiation medium)]

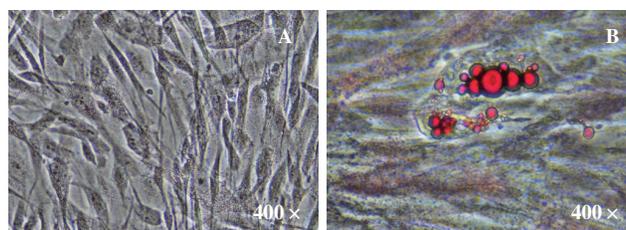
图 1 成骨分化实验结果

Fig. 1 Experimental results of osteogenic differentiation

### 2.5 成脂诱导分化实验

接种 MSCs 于 6 孔细胞培养板, 每孔  $2 \times 10^5$  cells, 培养 3 d 至细胞融合度达 100% 后再继续培养 1~3 d, 进行成脂分化诱导: 成脂诱导培养基分为 A 液、B 液, 分别按试剂盒说明书进行配制, B 液含基础培养基 175 mL、血清 20 mL、重组人胰岛素 200  $\mu$ L, A 液在 B 液基础上额外添加 IBMX 200  $\mu$ L、罗格列酮 200  $\mu$ L、地塞米松 200  $\mu$ L。诱导培养期间 A 液与 B 液进行 3 d/1 d 交替培养, 交替 3~5 次后, 用 B 液维持培养直至镜下观察脂滴变大变圆, 结束分化后, 吸弃上清液, 每孔用 PBS 2 mL 清洗 2 遍, 吸弃 PBS, 加入 4% 多聚甲醛 2 mL 固定 30 min, 用 PBS 2 mL 清洗 2 遍, 每孔加入油红 O 染色液 1 mL, 染色 30 min, 吸弃染液, 每孔加入 PBS 1 mL, 显微镜下观察。实验设对照组和诱导分化组, 每组双复孔。

MSCs 成脂诱导分化结果见图 2, 显微镜下观察可见实验组生成圆亮脂滴, 油红 O 染色后呈红色, 对照组未见脂滴分化, 提示干细胞具有向脂肪细胞分化的能力。



A. 对照组 (干细胞培养基培养) [control (MSCs cultured with stem cell culture medium)]

B. 实验组 (诱导分化培养基培养) [experimental group (MSCs cultured with induced differentiation medium)]

图 2 成脂分化实验结果

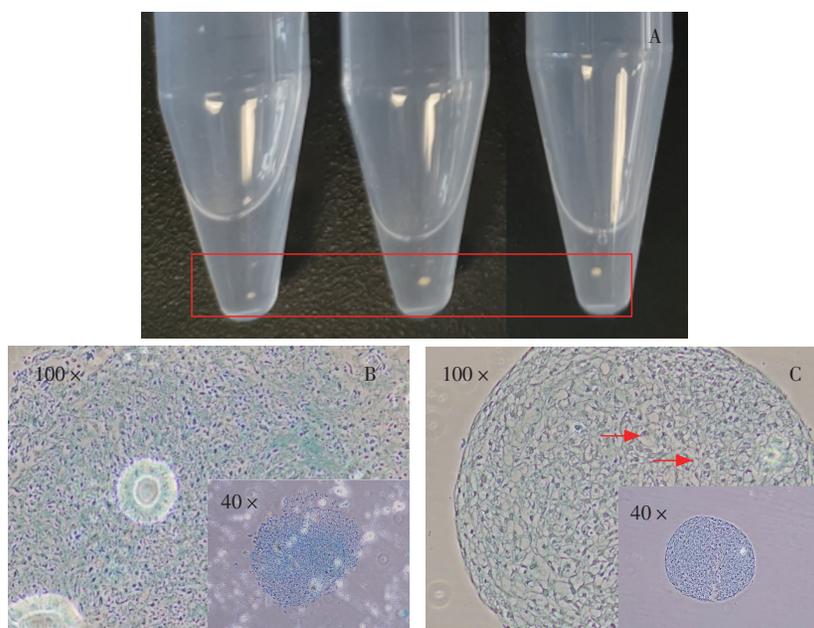
Fig. 2 Experimental results of adipogenic differentiation

### 2.6 成软骨诱导分化实验

将 MSCs 按每管  $4 \times 10^5$  cells 接种于 15 mL 离心

管中,250 g 离心 5 min。吸弃上清用培养基重悬细胞沉淀,150 g 离心 5 min,重复 3 次洗涤细胞后,每管加入诱导分化培养基(按试剂盒说明书进行配制,含基础培养基 194 mL、地塞米松 20  $\mu\text{L}$ 、抗坏血酸 400  $\mu\text{L}$ 、丙酮酸钠 200  $\mu\text{L}$ 、L-脯氨酸 200  $\mu\text{L}$ 、ITS 添加物 2 mL、TGF- $\beta$ 3 200  $\mu\text{L}$ ) 500  $\mu\text{L}$ ,于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  条件下培养,每 2~3 d 换液 1 次。诱导 21 d 后,将软骨球用 10% 福尔马林固定,经石蜡包埋后切片,脱蜡脱水后用阿利新蓝染色后封片,显微镜下观察染色效果。实验设对照组和诱导分化组,每组双复孔。

干细胞软骨分化结果见图 3,经专用培养基诱导 28 d 后,干细胞在离心管底部可形成软骨球(见图 3-A),轻弹离心管,可使软骨球悬浮。将该软骨球用福尔马林固定后进行石蜡包埋,切片后经阿利新蓝染色,显微镜下可观察到形成了类软骨陷窝结构(如图 3-C 红色箭头所示),标志干细胞向软骨细胞的分化。采用 MSCs 培养基培养的对照组细胞外观呈球状细胞团,但经上述固定染色操作后可见细胞团呈不规则形,且无明显的软骨陷窝结构(图 3-B)。



A. 分化后软骨球(differentiated chondrosphere) B. 对照组(干细胞培养基培养)[control (stem cell culture medium)] C. 实验组(诱导分化培养基培养)[experimental group (induced differentiation medium culture)]

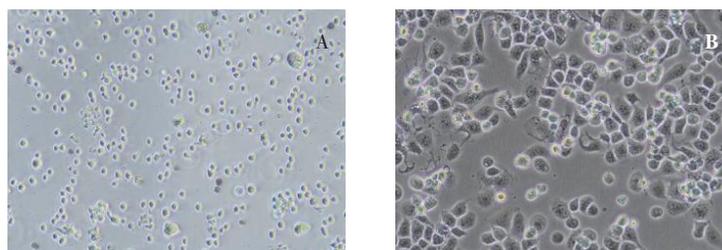
图 3 成软骨分化实验结果

Fig. 3 Experimental results of chondrogenic differentiation

## 2.7 MSCs 促巨噬细胞极化实验

接种 THP-1 细胞于 12 孔板,每孔  $5 \times 10^5$  cells,加入终浓度  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 PMA 诱导 THP-1 细胞贴壁,诱导处理 3 d。取培养上清作为阴性对照(Blank)。加入 LPS/MSCs 诱导巨噬细胞极化,实验分为 2 组,LPS 处理组:向诱导分化的 THP-1 细胞中加入终浓度为  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS,培养 24 h;LPS+MSCs 处理组:向已贴壁的 THP-1 细胞中接种 MSCs 细胞  $5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  共培养,加入终浓度  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS,培养 24 h。24 h 后收集各组实验上清液,ELISA 法(双抗夹心法,按试剂盒说明书进行实验)检测 TNF $\alpha$  和 IL-10 的含量。

THP-1 经 PMA 诱导 3 d 后,由悬浮细胞诱导分化为巨噬细胞(图 4)。Blank 组 IL10 的表达水平  $< 3.13 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Elisa 试剂盒标准曲线下限),对照组经 LPS 诱导 IL-10 的表达水平为  $37 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;MSCs 共培养组 IL-10 表达水平为  $122 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,为对照组的 3.2 倍;Blank 组 TNF $\alpha$  的表达水平  $< 15.63 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Elisa 试剂盒标准曲线下限),对照组的 TNF $\alpha$  表达水平为  $4688 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,MSCs 与 THP-1 共培养组 TNF $\alpha$  表达水平为  $1805 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,表达降低,约为对照组的 39%,结果见图 5。结果显示 MSCs 能明显抑制促炎因子 TNF $\alpha$  分泌表达( $P < 0.05$ ),并上调 IL-10 的分泌表达( $P < 0.05$ )。



A. THP-1 细胞(未诱导)(THP-1 cells without induction) B. THP-1 细胞(PMA 诱导 3 d)(THP-1 cells induced with PMA for 3 d)

图 4 THP-1 细胞诱导分化为巨噬细胞

Fig. 4 THP-1 cells is induced to differentiate into macrophages

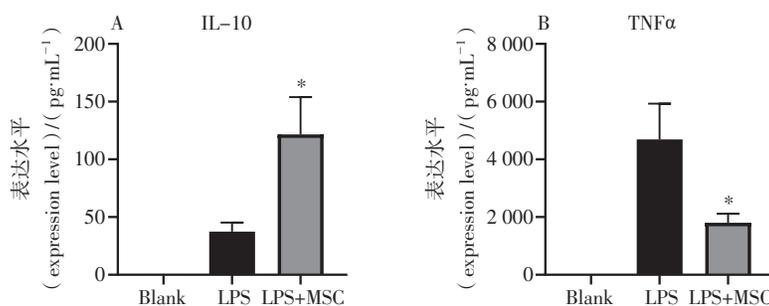


图 5 MSCs 促巨噬细胞极化结果

Fig. 5 Results of MSCs promoting macrophage polarization

注 (note): \*. MSCs 与 THP-1 巨噬细胞共培养组与 THP-1 巨噬细胞组比较 (MSCs co-cultured with THP-1 macrophage compared with THP-1 macrophage),  $P < 0.05$

### 2.8 淋巴细胞增殖抑制实验

96 孔板接种 MSCs 细胞  $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后加入 CFSE 染色的 PBMC 每孔  $3 \times 10^5 \text{ cells}$ , 同时加入 CD3/CD28 单抗偶联磁珠每孔  $10 \mu\text{L}$ , 于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件培养 8 d, 收获细胞进行流式检测, 实验分组见表 3, 每组 2 复孔,

同时设置 Blank 组, 分别为正常培养状态下的 PBMC 及 MSCs。按照如下公式计算淋巴细胞增殖抑制率, 其中 NC 为阴性对照 (无 CD3/CD28 刺激) 的增殖抑制率, PC 为阳性对照 (CD3/CD28 刺激组) 的增殖抑制率, S 为实验组 (MSCs 共培养组) 的增殖抑制率, CFSE FITC-H<sup>-</sup> 为增殖细胞百分率。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{S(\text{CFSE FITC} - \text{H}^-) - \text{NC}(\text{CFSE FITC} - \text{H}^-)}{\text{PC}(\text{CFSE FITC} - \text{H}^-) - \text{NC}(\text{CFSE FITC} - \text{H}^-)} \times 100\%$$

表 3 淋巴细胞增殖实验分组

Tab. 3 Groups of lymphocyte proliferation

成分 (ingredient)	Blank 1 (MSCs)	Blank 2 (PBMC)	NC	PC	S
PBMC	/	+	/	/	/
PBMC (CFSE)	/	/	+	+	+
MSCs	+	/	/	/	+
CD3/CD28 磁珠 (beads)	/	/	/	+	+

注 (note): /. 为该组别中不含该成分 (indicates that the component is not included in this group); +. 为该组别中含有该成分 (indicates that the component is included in this group)

结果显示 CD3/CD28 可刺激淋巴细胞增殖, MSCs 具有一定的抑制淋巴细胞增殖的能力, 抑制率约为 76.4% (表 4、图 6)。

表 4 增殖细胞百分比

Tab. 4 Percentage of proliferation cells

分组 (group)	增殖细胞百分比 (percentage of proliferation cells) / %
NC	$3.9 \pm 0.4$
PC	$74.8 \pm 0.2$
S	$20.6 \pm 1.8^{***}$

注 (note): \*\*\*, S 组与 PC 组比较 (PC compared with S),  $P < 0.001$

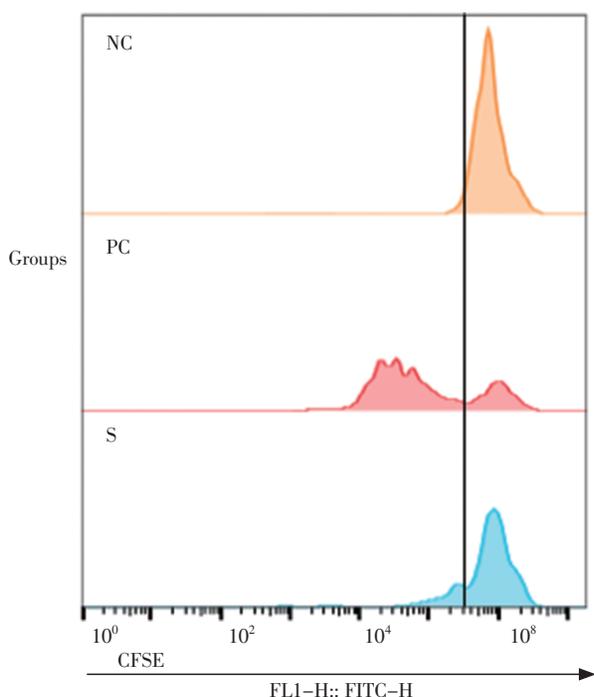


图6 MSCs对淋巴细胞增殖的影响

Fig. 6 Effects of MSCs on lymphocytes proliferation

### 3 讨论

目前国内外已出台了一系列针对干细胞产品的质量评价标准及规范,对干细胞产品从研发到生产的质量控制提出了建议。干细胞产品作为一种细胞治疗产品,其生物学属性是决定其疗效的关键,建立评价干细胞产品生物学活性的方法为临床研究提供了有力的依据。干细胞生物学活性检测主要从表面标志物表达、分化能力、免疫调控能力等方面进行研究,并建立质量标准。

本研究采用流式细胞术检测干细胞表面标志物并进行了方法学验证,主要考察了方法的特异性、精密度、重复性和耐用性,证明所建立方法可应用于干细胞产品检测。流式细胞术是检测细胞表面标志物表达的经典方法,操作简便、方法稳定,而且商品化的干细胞表面标志物检测试剂盒已比较成熟,易于推广应用。

干细胞分化采用不同的诱导分化试剂并结合染色法检测干细胞的成骨、成软骨和成脂分化能力,但显微镜下观察结果存在主观因素,且只能判断有无分化能力,尚不能量化,有研究用图片软件对进行染色区域面积进行分析,计算干细胞诱导分化率。在此基础上,还可考虑建立其他方法对干细胞分化能力进行评价,如有研究采用QPCR方法对软骨标志物SOX9

等进行mRNA水平的检测<sup>[19]</sup>。

干细胞的免疫调控能力可从多个角度进行评价,如干细胞对免疫调节因子分泌能力、对免疫细胞增殖能力及对巨噬细胞极化的作用等。本研究中建立了细胞共培养的方法联合流式细胞术和ELISA技术检测MSCs对总淋巴细胞增殖的作用以及对巨噬细胞极化的影响,可根据临床应用评价MSCs对Th1/Th17细胞亚群的抑制作用及促Treg细胞亚群增殖的能力。此外,有研究采用QPCR法检测MSCs对淋巴细胞中IL-6、CD206等相关因子mRNA表达水平的影响<sup>[20]</sup>,可考虑进一步进行方法学验证评价其是否可作为干细胞质量标准之一。由于干细胞复杂的生物学特性,国际细胞治疗协会(International Society of Cell Therapy)指出对MSCs的免疫功能检测方法的建立应标准化定量化<sup>[21]</sup>,因此建立可用于MSCs生物学活性评价的标准细胞株对干细胞有效性评价具有重要意义<sup>[22]</sup>,可根据干细胞产品特点建立相应的标准细胞株,用于干细胞产品的有效性评价。

本研究中MSCs生物学活性方法均基于相关法规规范,能满足干细胞检定的基本要求。随着干细胞产品新功能新适应症的不断研究与发展,还需不断探索新方法新技术在干细胞产品生物学活性检测领域的应用,为干细胞产品的质量提供有力技术支撑。

### 参考文献

- [1] 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
- [2] 王泽,宋扬,秦林伟. 干细胞的研究进展和应用前景[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2021, 39(6): 566  
WANG Z, SONG Y, QIN LW. Research progress and application review of stem cells [J]. *J Shenyang Norm Univ: Nat Sci Ed*, 2021, 39(6): 566
- [3] 马杰,史明霞,赵春华. 间充质干细胞与血液系统疾病[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(3): 346  
MA J, SHI MX, ZHAO CH. Mesenchymal stem cells and hematological diseases [J]. *Basic Clin Med*, 2007, 27(3): 346
- [4] 王友臣,史恩祥. 间充质干细胞应用的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(20): 3806  
WANG YC, SHI EX. Research progress on the application of mesenchymal stem cells [J]. *J Pract Med*, 2011, 27(20): 3806
- [5] 何萍,程涛,郝莎. 干细胞临床研究的现状及展望[J]. 中国医药

- 生物技术, 2020, 15(3): 290
- HE P, CHENG T, HAO S. The status quo and prospect of clinical study on stem cells [J]. *Chin Med Biotech*, 2020, 15(3): 290
- [ 6 ] 袁宝珠. 干细胞产品生物学有效性评价的基本原则 [J]. 中国生物制品年会暨第十六次全国生物制品学术研讨会, 2016
- YUAN BZ. Basic principles for evaluating the biological effectiveness of stem cell products [R]. *China Bio Prod Annual Conference and 16<sup>th</sup> Nat Symposium Bio Prod(CBPC)*, 2016
- [ 7 ] ULLAH I, SUBBARAO RB, RHO GJ. Human mesenchymal stem cells—current trends and future prospective [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(2): 1
- [ 8 ] 吕林洁, 王长生, 王晓冰, 等. 间充质干细胞治疗膝骨性关节炎的临床研究进展 [J]. *中华细胞与干细胞杂志 (电子版)*, 2021, 11(6): 365
- LÜ LJ, WANG CS, WANG XB, *et al*. Clinical progression of mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis [J]. *Chin J Cell Stem Cell (Elect Ed)*, 2021, 11(6): 365
- [ 9 ] 闫小滨, 郭志坤. 脂肪来源间充质干细胞的生物学特性及临床应用前景 [J]. *解剖科学进展*, 2009, 15(4): 416
- YAN XB, GUO ZK. Bionomics and clinical application prospect of adipose derived mesenchymal stem cells [J]. *Prog Anatom Sci*, 2009, 15(4): 416
- [ 10 ] 杨莹, 李政楠, 王秀娟, 等. 脐带来源间充质干细胞的免疫抑制功能研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(12): 2385
- YANG Y, LI ZN, WANG XJ, *et al*. Research on immunosuppressive function of umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(12): 2385
- [ 11 ] CHEN YH, YANG LH, LI XH. Advances in mesenchymal stem cells regulating macrophage polarization and treatment of sepsis-induced liver injury [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1238972
- [ 12 ] LUZ-CRAWFORD P, KURTE M, BRAVO-ALEGRÍA J, *et al*. Mesenchymal stem cells generate a cd4+cd25+foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of th1 and th17 cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3): 65
- [ 13 ] 王方迪, 侯瑞霞, 李俊琴, 等. 间充质干细胞对 T 细胞免疫调节机制的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(22): 2715
- WANG FD, HOU RX, LI JQ, *et al*. Research progress of mesenchymal stem cells on immunomodulatory mechanism of T lymphocyte [J]. *Chin J Immunol*, 2021, 37(22): 2715
- [ 14 ] 汪健芳, 莫春阳, 许艳华, 等. 骨髓间充质干细胞的临床应用研究 [J]. *中国细胞生物学报*, 2018, 40(13): 2145
- WANG JF, MO CY, XU YH, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells and its clinical applications [J]. *Chin J Cell Biol*, 2018, 40(13): 2145
- [ 15 ] 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
- ZHANG KH, NA T, HAN XY, *et al*. Immunomodulatory properties-based strategy for the assessment of biological effectiveness of mesenchymal stem cells [J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25(3): 283
- [ 16 ] 胡资兵, 曾荣, 郭伟韬, 等. 骨髓间充质干细胞诱导分化特征 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43): 8561
- HU ZB, ZENG R, GUO WT, *et al*. Induction and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Clin Rehab Tissue Engin Res*, 2008, 12(43): 8561
- [ 17 ] 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则 (试行) [S]. 2023: 4
- Guiding Principles for Pharmaceutical Research and Evaluation of Human Stem Cell Products (Trial) [S]. 2023: 4
- [ 18 ] 张可华, 刘静, 纳涛, 等. 人间充质干细胞体外成软骨分化能力综合评价策略研究 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(18): 2196
- ZHANG KH, LIU J, NA T, *et al*. A comprehensive evaluation strategy for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Chin J New Drugs*, 2017, 26(18): 2196
- [ 19 ] FENG L, YANG ZM, LI YC, *et al*. Linc-*ror* promotes mesenchymal stem cells chondrogenesis and cartilage formation via regulating *sox9* expression [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(4): 568
- [ 20 ] 尹学红, 庞春燕, 白力, 等. 脂肪间充质干细胞促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(3): 332
- YIN XH, PANG CY, BAI L, *et al*. Adipose-derived stem cells promote the polarization from M1 macrophages to M2 macrophages [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32(3): 332
- [ 21 ] KRAMPERA M, GALIPEAU J, SHI Y, *et al*. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—the international society for cellular therapy (ISCT) working proposal [J]. *Cytherapy*, 2013, 15(9): 1054
- [ 22 ] 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
- ZHANG KH, NA T, HAN XY, *et al*. Establishment of a reference cell line, CCRC-hMSC-S1, for the evaluation of biological effectiveness of human mesenchymal stem cells [J]. *Chin J New Drugs*, 2020, 29(21): 2502

(本文于 2024 年 12 月 9 日收到)