

间充质干细胞生物学效力检测方法研究进展

王进美,秦美蓉,王 平,王 冰*

(深圳市药品检验研究院,深圳 518057)

[摘要] 间充质干细胞(mesenchymal stromal/stem cells, MSCs)的生物学效力检测在产品开发、工艺开发、批放行、临床使用及上市后质量监管的多个研究阶段起着至关重要的作用,但至今尚未形成标准和规范的 MSCs 生物学效力检测方法和/或指南类文件。其难点在于 MSCs 作用机制复杂且尚未完全阐明以及 MSCs 较大的异质性和对照品的缺失。本文阐述了 MSCs 的体内命运和作用机制,总结影响 MSCs 生物学效力的因素,提出了 MSCs 生物学效力检测的要求和当前面临的问题,并提出解决思路,以期为我国 MSCs 的科学监管和产业发展提供参考。

[关键词] 间充质干细胞;异质性;免疫抑制实验;血管再生

[中图分类号] R915 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2025)20-2151-10

Advance in potency assay for mesenchymal stromal cells

WANG Jin-mei, QIN Mei-rong, WANG Ping, WANG Bing*

(Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China)

[Abstract] Potency assay for mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) plays a crucial role in product development, process development, product release, clinical use, and post marketing regulation. There are yet no standard and standardized tests for potency of MSCs. The complex and unclear mechanisms of MSCs, variability of MSCs, and lack of reference materials are confounders for achieving sustainable potency measurements. In this review, the fate *in vivo* and mechanisms of MSCs were described firstly, and then the factors that affect the potency of MSCs were also summarized. Finally, the requirements for the determination of MSCs potency and the current problems were put forward, and solutions were proposed, in order to provide references for the scientific supervision and industrial development of MSCs in China.

[Key words] mesenchymal stromal/stem cells; variability; immune cell inhibition assay; angiogenesis

随着全球间充质干细胞(mesenchymal stromal/stem cells, MSCs)研究开发的推进,国外已有 MSCs 药品上市,国内也有多款 MSCs 产品处于Ⅲ期临床试验阶段,行业发展对 MSCs 生物学效力检测方法提出了新的要求。美国 FDA 考虑到细胞和基因治疗(cell and gene therapy, CGT)产品的多变性,采取

了开放式策略,建议效力测定应基于每一个具体品种,在具体方法的选择上留有较大灵活性^[1]。欧洲 EMA 与美国 FDA 观点类似,认为效力测定应基于产品特征和相关的生物学特性^[2-3]。我国也强调需要基于产品与临床相关的治疗活性或预期的生物学效应,开发能够代表产品作用机制的定量生物学活性/功能测定方法^[4]。

虽然各国监管机构发布的 CGT 产品指导原则中均有关于生物学效力测定的内容,但均未形成针对 MSCs 效力测定的检测方法或指南类文件。不同产品效力评价方法差异较大,3 款已批准上市的异

[作者简介] 王进美,女,博士研究生,主要从事细胞和基因产品的质量评价研究。E-mail: wangjinmei067@163.com。

[通讯作者] *王冰,男,副主任药师,主要从事药品质量控制与标准研究工作。联系电话:(0755)86544263, E-mail: 1434290506@qq.com。

[DOI] 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.20.004

体来源 MSCs 产品及其效力评价方法见表 1。最近,美国 FDA 再次驳回了 Mesoblast 公司 Remestemcel-L 的上市申请,认为其所使用的鉴定和效力测定方法

不能反映产品批次的异质性,效力测定结果与临床数据之间缺乏相关性,必须定义额外的效力测定,以提供更有意义的产品临床有效性测量数据。

表 1 3 款异体来源 MSCs 药品及其效力评价方法

商品名	细胞来源	适应证	给药方式	效力评价方法	批准时间	批准区域	参考文献
Temcell (JR-031, Remestemcel-L, Prochymal, Ryoncil)	骨髓	aGvHD	静脉注射	活性 ELISA; TNFR1 活化 T 细胞的 IL-2R α 表达抑制	2015 年	日本	[5-6]
Alofisel (Darvadstrocel 或 Cx601)	脂肪	克罗恩病相关肛周瘻	病灶内给药	生长动力学; 活性; 分化能力; 免疫调节; 免疫相关蛋白质; 再生和旁分泌相关蛋白质	2018 年	欧盟	[7]
Stempeucel	骨髓	严重肢体缺血	小腿肌肉和溃疡周围给药	ELISA; VEGF	2020 年	印度	[8-9]

aGvHD:急性移植抗宿主病;ELISA:酶联免疫吸附实验;TNFR1:肿瘤坏死因子受体 I 型;IL-2R α :白细胞介素-2 受体 α 亚基;VEGF:血管内皮生长因子

MSCs 效力检测方法开发的难点在于 MSCs 作用机制复杂且尚未完全阐明以及 MSCs 较大的异质性和缺少合适的对照品。据此,本文阐述了 MSCs 的体内命运和作用机制,总结影响 MSCs 生物学效力的因素,提出了 MSCs 生物学效力检测的要求和当前面临的问题,并提出解决思路,以期为我国 MSCs 的科学监管和产业发展提供参考。

1 MSCs 体内命运

了解 MSCs 的体内命运是理解其作用机制的前提。MSCs 是回到目标病变部位以达到预期效果还是通过远程控制起作用,这些信息至关重要。虽然当前 MSCs 体内命运的动态过程及其与生物学效力的相关性尚未完全研究清楚,但有些重要信息值得关注。

1.1 MSCs 的体内分布

MSCs 的典型直径在 15 ~ 30 μm 之间,连续体外传代后其尺寸将变得更大。MSCs 相对较大的体积导致其在静脉给药后被肺毛细血管系统捕获,这种现象被称为肺首过效应。人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)予小鼠静脉注射数分钟后,约 80% 的 hMSCs 在小鼠肺部被观察到,之后数小时至数天内, hMSCs 再分布到小鼠的肝脏、脾脏或其他组织,并逐渐从体内完全消失,半衰期为 24 h。MSCs 的肺部捕获是影响其生物分布的关键因素。MSCs 体内分布受到给药途径、细胞大小、细胞来源、培养条件、细胞免疫学特征、标记和检测方法以及动物大小和疾病模型的影响。

1.2 MSCs 归巢(homing)

MSCs 跨越血管内皮定向趋化至损伤部位,在目标组织中被捕获,这一过程称为“归巢”。MSCs 的归巢机制仍在研究中,一般认为其表面表达趋化因子和生长因子等受体,这些受体与相应配体相结合,共同趋化 MSCs 至靶器官。目前已报道的 MSCs 归巢相关分子包括:趋化因子受体(如 CCR2, CCR4, CCR7, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6 和 CXCR7)、黏附分子选择素和整合素[如 E-选择素/CD44、白细胞配体 α -4/血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)]、基质金属酶(如 MMP-1/2/9)以及受损组织分泌的因子[如基质细胞衍生因子 1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和趋化因子(CXCL12, CCL5, CCL2)等^[10-12]]。阐明这些分子在 MSCs 归巢过程中的作用机制将为提高 MSCs 在临床应用中的有效性奠定理论基础。MSCs 归巢能力与所处的炎症环境以及培养条件高度相关^[13],对依赖于向特定部位迁移为作用基础的产品,应评估 MSCs 的归巢效力。尽管 MSCs 具有向损伤组织特异性归巢的特性,但最终在靶部位测到的归巢量极少。

1.3 MSCs 的远程调控

大多数静脉注射的 MSCs 分布在肺脏、脾脏和肝脏中,可能通过肺-脑轴、脾-肾轴等发挥远程调控作用。脾脏作为最大的淋巴器官,在病原体的捕获和清除、红细胞周转、铁循环、炎症反应的调节以及趋化因子和细胞因子的产生等方面发挥重要作用,可能是 MSCs 介导的急性或慢性炎症缓解的关键器官之一。在大鼠肾小球肾炎模型中,静脉注射的人

脂肪来源 MSCs 在脾脏内积聚,而不是肾脏。脾脏内的 MSCs 分泌功能性细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EV) 转移到脾脏 M2 巨噬细胞,随后 EV 增强的 M2 巨噬细胞从脾脏释放,通过血流到达炎症肾脏,减少肾脏中 M1 巨噬细胞并调节肾脏免疫环境,揭示了多器官免疫网络机制^[14]。在小鼠急性心肌梗死模型中,人骨髓来源 MSCs 经静脉注射后分布到多个器官,但只有小部分分布到心肌。与正常小鼠对比,急性心肌梗死小鼠脾脏中 MSCs 积累明显增加, MSCs 可能通过分泌因子降低了脾脏 NK 细胞的百分比,而 NK 细胞调节中性粒细胞,减少心肌中性粒细胞的积累,从而减少心肌梗死后的不良心肌重构^[15]。最近, Huang 等^[16]发现静脉注射聚集在肺部的 MSCs 可以通过分泌脑源性神经营养因子激活肺迷走神经-结状神经节-孤束核-中缝背核神经环路调控中枢 5-羟色胺能血清素能系统,改善小鼠抑郁/焦虑样行为;而在髓鞘少突胶质细胞糖蛋白诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型中,肺脏是髓磷脂反应性 T 细胞进入中枢神经系统并造成损伤之前必须经过的归巢生态位和激活位点,肺脏 MSCs 凋亡可能引起肺部免疫细胞功能的变化并影响外周免疫反应,改善了 EAE 组织损伤^[17]。

1.4 MSCs 清除

静脉注射的 MSCs 被肺部捕获并迅速凋亡和清除,线粒体凋亡可能是肺脏 MSCs 凋亡的主要途径。凋亡 MSCs 可能通过释放可溶性“find-me”信号和暴露“eat me”信号,被一系列具有吞噬能力的细胞吞噬,体内驱动 MSCs 凋亡的确切机制还在研究中。在小鼠 GvHD 模型中,发现 MSCs 凋亡依赖于受体小鼠中的细胞毒性细胞 (可能是 $CD8^+$ T 细胞和 $CD56^+$ NK 细胞)^[18]。而 NSG 和 BRGS 小鼠缺乏 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,但两者的肺脏都存在髓源性细胞,在没有适应性免疫反应和细胞毒性细胞的情况下, MSCs 也能被快速清除,表明 MSCs 凋亡与免疫细胞无关,可能由其他因素驱动 (如营养/生长因子剥夺驱动),并被髓源性细胞清除^[17]。

2 MSCs 作用机制

早期研究认为,基于 MSCs 体外多能分化作用, MSCs 可能通过体内替代或分化为受损细胞参与组织修复,然而,细胞追踪技术和长期随访研究显示事实可能并非如此。在过去的 10 年中,研究重点已经转向利用 MSCs 刺激先天组织修复和调节免疫炎症的能力。MSCs 分泌组、线粒体转移以及凋亡-胞葬等多种机制可能协同作用以实现 MSCs 的功能^[19]。MSCs 可能的体内作用机制见图 1。

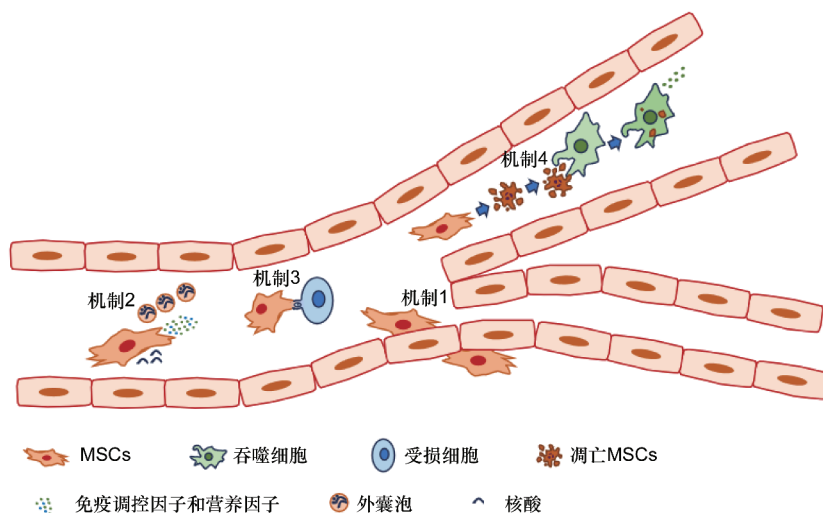


图 1 MSCs 体内作用机制图

静脉注射的 MSCs 可能跨越血管内皮定向趋化至损伤部位以发挥作用 (机制 1),但通常归巢的细胞量极少, MSCs 主要分布在肺脏、脾脏和肝组织,这些器官可能在 MSCs 远端调控中发挥作用。血液或

组织中的 MSCs 可能通过分泌免疫调控因子、营养因子和外囊泡等发挥近程和/或远程作用 (机制 2),也可能通过纳米隧道管等传递物质 (如线粒体) 以修复受损细胞 (需要到达靶器官,机制 3),还可能因

为营养剥夺和/或被细胞毒性细胞诱导凋亡,并被血液内循环的单核细胞和/或组织驻留的巨噬细胞等吞噬细胞吞噬胞葬并引起吞噬细胞免疫表型和功能改变而发挥作用(机制4)。

2.1 分泌分子

一般认为,MSCs分泌产物中的代谢酶、免疫调控细胞因子、趋化因子和生长因子等起到了关键作用。MSCs分泌的重要分子包括吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)、环氧化酶2(cyclooxygenase-2,COX2)、前列腺素E2(prostaglandin E2,PGE2)、VEGF、肿瘤坏死因子 α 刺激基因/诱导蛋白-6(tumor necrosis factor α stimulated gene 6,TSG-6)、 γ 干扰素诱导蛋白-10(interferon gamma inducible protein-10,IP-10)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)、VCAM-1、细胞程序性死亡-配体1(programmed cell death ligand 1,PD-L1)、IL-6、转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1,MCP-1)等,这些分子在免疫调节、血管新生、招募内源性干细胞参与组织修复、抗凋亡或抗纤维化中起到关键作用^[20-24]。多项研究表明,MSCs分泌分子受到环境的影响,许多研究集中在改变培养条件,以引导MSCs分泌分子向特定方向发展。

2.2 EV

EV是细胞在受到刺激或凋亡时分泌的膜封闭实体。根据来源和大小不同,EV可分为3种亚型:从内体腔室释放的外泌体(<150 nm)、从质膜出芽产生的微囊泡或微粒(>150 nm)和凋亡细胞解体产生的凋亡小体(50~5 000 nm)。EV通过其表面受体与细胞膜直接接触或通过膜融合进入受体细胞,向受体细胞传递重要的生物信息刺激下游细胞通路,在许多生物学过程和细胞间通讯中起着重要作用^[25]。EV传递不同类型的分子,如蛋白质、脂质和核酸等。miRNA可能是EV发挥重要作用的介质,其中重要的miRNA包括miR-21,miR-125b,miR-22,miR-133b,miR-23b,let-7a-5p,miR-145和miR-146等^[26-27]。EV大小和成分是高度可变的,与来源细胞和培养条件有关。

2.3 线粒体转移

线粒体功能障碍是衰老的标志之一,并与多种疾病的发病机制有关,MSCs通过补充或替换目标病

变细胞中受损的线粒体发挥其作用^[28-29]。MSCs线粒体转移的方式可以大致分为3类:①依赖细胞间接触的作用方式。MSCs通过与受体细胞形成短暂的细胞连接(包括隧道纳米管和间隙连接等),将线粒体转移到受体细胞。②EV介导的线粒体转移。③游离线粒体。MSCs线粒体转移可以影响受体细胞的增殖、分化、代谢、炎症反应、衰老、氧化应激和迁移等重要过程^[30]。当前,线粒体转移的确切机制仍在研究中,MSCs的组织来源、受体细胞以及所处的环境可能影响线粒体转移的能力。

2.4 体内凋亡-胞葬

凋亡-胞葬机制认为,MSCs在体内的免疫作用主要由循环的单核细胞和/或组织驻留的巨噬细胞吞噬凋亡的MSCs介导。MSCs胞葬会引起单核细胞和/或巨噬细胞的免疫表型和功能改变,从而调节免疫系统^[18,31-32],该机制可能根据疾病环境和给药途径而有所不同。在小鼠GvHD模型中,采用静脉和腹腔注射2种给药途径注射凋亡MSCs,发现只有腹腔注射的凋亡MSCs能够显著减少GvHD效应细胞在脾脏和肺部的浸润。缺失凋亡效应因子BAK和BAX可阻止MSCs凋亡,并减弱其免疫抑制作用^[17]。

3 MSCs效力影响因素

构建MSCs效力评价方法的难点在于MSCs有较大的异质性,包括细胞来源、生产工艺、微环境、给药途径以及患者情况等,这些都会影响MSCs的生物学效力^[33]。

3.1 细胞来源

MSCs可以分为自体来源和异体来源。其来源丰富,包括骨髓、脂肪、脐带、胎盘、宫内膜、牙髓、羊水和羊膜等,不同组织来源的MSCs在表面标志物、细胞增殖、分化、免疫调控、促血管生成、细胞迁移和旁分泌等方面存在较大差异^[34]。

不同来源MSCs的功能差异可能部分与其发育起源有关。MSCs的发育起源可能包括神经嵴(神经外胚层,如头面部、牙及骨髓间质等)、中胚层(脊柱、四肢等,如轴旁中胚层、侧板中胚层、中间中胚层)和滋养外胚层(如脐带、胎盘等)^[35-37]。神经嵴来源的MSCs具有更强的成骨、成软骨分化能力以及更强的修复血脑屏障损伤和改善卒中后神经的功能^[38-40];中胚层来源MSCs具有更强的免疫调节与造血支持能力^[41]。使用生物测定和基因分型对不同来源的MSCs进行仔细表型表征将有助于区分

细胞性能。同时,供体年龄、性别和身体状况也会影响 MSCs 的生长动力学、分化潜能和免疫调节能力等^[42]。

3.2 生产工艺和微环境

血清、微载体、2D 或 3D 培养、代次、是否冻存、

冻存方法、冻存时间和复苏-平衡时间等因素会影响 MSCs 的生长、增殖和分泌组成^[43-44]。同时, MSCs 可能经过不同的微环境激活和/或处理,显著改变分泌组的组成,从而影响 MSCs 的生物学效力^[45-49]。部分生产工艺和微环境对 MSCs 功能的影响见表 2。

表 2 部分生产工艺和微环境对 MSCs 功能影响

生产工艺或微环境	影响	文献
可溶性信号因子		
培养基	血小板源生长因子、TGF-β1、肝素结合表皮生长因子和胰岛素生长因子-1 等影响 MSCs 的增殖、迁移和多能分化潜能。在限定化学成分培养基中, MSCs 的特异性表面抗原(如 STRO-1、CD166、CD73、CD44、CD105 和 CD146)发生变化	[50-52]
IFN-γ	IFN-γ 通过 JAK/STAT 信号激活 MSCs 中 IDO-1、HGF 和 TGF-β 的转录和合成。IFN-γ 预处理后,512 个免疫调节相关基因表达上调。IFN-γ 激活 MSCs 免疫抑制活性,但同时影响 MSCs 的生长和存活能力并降低 MSCs 对缺血性卒中的疗效	[53-55]
丙戊酸	增强 MSCs 的免疫抑制效力和代谢活性	[56]
脂多糖	刺激 MSCs 表达趋化和炎症反应相关物质	[57]
氧		
低氧(2%~5% O ₂)	短暂低氧处理促进 MSCs 生长和归巢,通过降低 caspase-3 的酶活性起到抗凋亡作用,增加 MSCs 中促血管生成基因的表达,促进血管生成和植入	[13, 58-59]
3D 培养		
3D 球	3D 培养通过增加 EV 分泌减少 MSCs 的大小,增强了运输能力,减少肺血管阻塞。3D 培养增强了炎症调节因子 TSG6、STC1 和 COX2 的表达,抑制巨噬细胞中 TLR-2/NF-κB 信号传导,减少促炎介质的产生	[60-61]
基质组成		
细胞外基质	与塑料培养皿相比, MSCs 在细胞外基质上培养时产生较少的 IL-6,而产生更多的 VEGF 和胶质细胞源性神经营养因子	[62]
基质力学		
基质刚度	影响 MSCs 分化, MSCs 在低刚度底物上表达神经源性标志物,在中等刚度底物上表达肌源性标志物,在硬底物上表达成骨标志物	[63-64]
物理刺激		
循环拉伸	循环拉伸可以促进 MSCs 向神经元转分化,部分通过调节 Rho GTPase 活性起作用, Rho GTPase 是 miR-124 的靶标(miR-124 的表达在中枢神经系统发育过程中逐渐增加)	[65]
是否冻存		
冻存	新鲜解冻的 MSCs 缺乏必要的免疫抑制活性,而解冻 24 h 后,其免疫抑制活性、IFN-γ 反应性和 IDO 诱导恢复	[66]

IFN-γ:干扰素;TLR-2: Toll 样受体 2;Rho GTPase: Rho 鸟苷三磷酸酶

3.3 给药途径

MSCs 的给药方式包括静脉给药和局部给药等,静脉给药是最常用的给药方式^[67]。同一种临床适应证可能有多种给药方式,不同递送方式影响 MSCs 体内存活、迁移和分布^[33,67]。直接递送到靶器官可以最大限度地发挥 MSCs 旁分泌作用, Alofisel 治疗克罗恩病相关肛周瘘的成功开发是这一策略的典型案例^[67]。将 MSCs 包埋在生物材料中植入可能对 MSCs 活化、效力持久性和临床疗效产生深远影响。但是也有文献表明,组织靶向递送可能适得其反或

者呈现与静脉递送一样的效果^[68-69]。对于需要组织靶向的疾病适应证,减小 MSCs 尺寸以绕过最初的肺捕获和调节细胞表面特性增强器官特异性捕获可能至关重要。

3.4 患者特征

越来越多的证据表明,在确定 MSCs 效力时,不仅要考虑细胞产物,还要考虑患者特异性生物标志物和/或免疫特征^[70-71]。胃肠道 GvHD 患者在 MSCs 输注前的肠道活检显示,有反应和无反应患者的炎症特征存在显著差异。与 MSCs 无应答的

患者相比, MSCs 应答患者的肠道黏膜肥大细胞活性、CD8⁺ Treg 细胞和 Fox P3⁺ 细胞增加, CD4⁺, CD56⁺ 和 CD68⁺ 细胞水平降低, 其中 CD4⁺ 和 CD8⁺ Treg 细胞可能是 MSCs 应答的重要介质^[72]。患者的细胞毒性反应、疾病严重程度和疾病发展阶段等也是影响 MSCs 效力的重要因素^[67,73]。有研究表明, GvHD 患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)诱导 MSCs 凋亡的能力与临床效力有关, 高细胞毒性的患者对 MSCs 治疗有反应, 而低细胞毒性或缺乏细胞毒性的患者在 MSCs 输注后没有改善^[31]。

4 MSCs 效力评价方法

效力评价方法应基于 MSCs 将用于治疗疾病的病理生理学和 MSCs 的潜在作用机制而开发。MSCs 具有多种作用机制, 应基于最关键的一种或多种作用机制开发检测方法。原则上, 应该采用定量生物测定法测定 MSCs 的生物学效力。在开发合适的生物测定方法不可行或不实际的情况下, 也可以采用替代方法, 以便提供快速、可重复和更定量的分析方法。MSCs 功能广泛, 本文以免疫调节和血管新生为例进行评价方法的阐述。

4.1 免疫调节

普遍认为, 免疫调节不是 MSCs 的固有特征, 而是 MSCs 被炎性环境激活或启动后的结果。被激活或启动后的 MSCs 能够通过多种作用机制介导多种细胞类型的免疫调节作用, 包括适应性免疫和先天免疫。多个研究表明, MSCs 的免疫调节与 MSCs 的组织来源和生产方法无关。基于此, 2016 年国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)提出在后期临床试验阶段, 应将 MSCs 免疫调节功能作为效力放行检测^[74]。

4.1.1 生物测定法 MSCs 体外免疫调节特性最常研究的是其对 T 细胞的作用, PBMC 可作为 T 细胞的来源。T 细胞可以通过多种方法被激活, 如混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)、T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)与抗 CD3 和抗 CD28 抗体结合以及 TCR 被植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)或佛波酯和离子霉素激活。测量参数包括分泌因子产生、细胞增殖、细胞表面标记物表达、细胞迁移和代谢途径的变化等。Hansen 等^[75]对免疫抑制实验中 T 细胞的活化方法进行了比较和优化, 从 T 细胞增殖响应、MSCs 抑制效果、可行性、供应链、成本和特异性考量角度出发, 建议使用 PHA

进行方法构建。在具体免疫应答细胞的选择上, 一般建议根据临床适应证和预期用途选择评价方法, 如自身免疫性疾病应选择 Treg 实验(Treg 细胞对免疫耐受性至关重要)^[76]。

MSCs 可以通过调节单核细胞和巨噬细胞的表型促进组织修复, 因此在某些条件下, 评估 MSCs 对先天免疫细胞的影响可能更有价值。Ribeiro 等^[77]提出了一种基于流式细胞术检测 MSCs 与脂多糖刺激的全血共培养后肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)在单核细胞中的表达, 并发现 MSCs 对单核细胞中 TNF- α 表达抑制具有剂量依赖性。其他可能用于检测 MSCs 对单核细胞/巨噬细胞极化影响的效价测定方法包括体外吞噬测定、巨噬细胞表型表面标记物(如 CD163, CD206)和活性氧产生的测定等^[78-79]。

4.1.2 替代方法 由于生物测定法存在耗时、PBMC 批次间差异大以及无合适的对照品等缺点, 替代方法日益受到关注。当 MSCs 体外暴露于促炎因子时, MSCs 将经历极化, 由静息状态变为激活/启动状态, 比较静息和激活/启动状态下 MSCs 免疫相关的表面标志物、分泌(组)或转录(组)水平的差异是 MSCs 生物学效力测定的替代方法。单一测定可能很难预测效力, 建议采用测定集合的方法, 并需要建立替代方法与效力之间的相关性。

MSCs 活化方法很多, 如 IFN- γ , TNF- α 或 IL-1 β 处理, ISCT 推荐用 IFN- γ 处理 MSCs 12 ~ 48 h。经 IFN- γ 活化的 MSCs, 其表面标志物 CD40、人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)-ABC、HLA-DR、PD-L1 和细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达量显著升高, IDO, CXCL9, CXCL10, CXCL11 和 II 类主要组织相容性复合物反式激活因子(class II major histocompatibility complex transactivator, CII TA)的转录水平提高了千倍以上^[74]。Guan 等^[80]使用流式细胞术评估了一组生物标志物, 结果显示, IFN- γ 激活后 MSCs 中 IDO-1 和 PD-L1 的表达水平与为期 5 d 的 MLR 实验中 T 细胞增殖抑制呈正相关, 而骨髓基质抗原 2、血管细胞黏附蛋白-1 或细胞间黏附分子-1 的表达水平与此无关。纳涛等^[81]以 IFN- γ 激活 MSCs, 建立并优化了一种基于 IDO 的快速评价 MSCs 免疫调控功能的吸光光度法。Lee 等^[82]检测了来自 13 个不同供体的骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BM-MSCs)中 6 种免疫

抑制基因的转录水平,结果显示其中 *TSG-6* 的水平与治疗 3 种小鼠无菌炎症(角膜损伤、无菌腹膜炎和博莱霉素诱导的肺损伤)的疗效相关。另外预测 MSCs 效力的生物标志物是 *COX2* 和 *PGE2*。Kota 等^[83]的研究表明,来自不同羊水和骨髓供体的 MSCs 制剂具有不同水平的 *COX2* 和 *PGE2* 基因表达,*COX2* 和 *PEG2* 基因的表达水平与体外培养的 MSCs 的抗炎特性以及创伤性脑损伤大鼠模型中小胶质细胞积累和激活的减少有关。

4.2 血管再生

对于局部缺血性疾病(如心肌梗死、缺血性脑中风、严重肢体缺血),MSCs 通过旁分泌作用促进血管再生可能是其重要的作用机制,主要表现为调节内皮细胞行为,包括增殖、迁移和血管形成。

对于血管再生功能的检测方法可以分为 2 类:

① 测定 MSCs 分泌促血管生成相关因子实验。
② 测定目标细胞功能实验。VEGF 的表达水平与内皮细胞功能如迁移、增殖和血管形成相关,因此定量测定 VEGF 的含量可以作为 MSCs 血管再生功能测定的替代方法^[8]。乙醛脱氢酶与氧化应激有关,也有研究者以乙醛脱氢酶的表达水平作为血管再生功能的替代标志物^[84]。除此之外,MSCs 还产生许多其他促血管生成因子,如血管生成素-1、胎盘生长因子和碱性成纤维细胞生长因子,这些因子也可以作为 MSCs 血管生成功能的替代生物标志物。测定目标细胞功能实验中,例如:可以测定 MSCs 或 MSCs 条件培养基诱导内皮细胞迁移、增殖和血管形成的能力,常用的实验包括划痕实验、基质胶血管生成实验、体外主动脉环实验等^[85]。Iqbal 等^[86]开发了一种基于 MSCs 与成年大鼠主动脉环共培养的方法,共培养 5 d 后,相比于对照组,共培养组的内皮网络从主动脉环向外呈放射状生长。Brennen 等^[87]将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)与明胶包被的葡聚糖珠结合,然后嵌入模拟伤口愈合微环境的纤维蛋白基质中,并在显微镜下观察 MSCs 条件培养基诱导 HUVEC 发芽和血管形成的过程,从而评估 MSCs 条件培养基的促血管生成能力,该方法突破了 2D 体外血管生成的局限性。

5 问题和展望

本文在阐述 MSCs 作用机制的基础上,对影响 MSCs 生物学效力以及常见的体外效力评价方法进行了分类总结和比较。替代方法日益受到关注,但

是当疾病发病机制复杂、MSCs 具有多种作用机制以及关键作用机制不确定时,替代方法与效力之间的相关性可能难以证明。同时,当前测定方法缺乏合适的对照品/参考品。针对这些问题,本文提出了如下解决思路。

5.1 多因素多重检测

当关键机制不确定时,单个生物测定或替代方法可能无法提供充分的效力测量,建议采取测定集合的方法。

对于分泌因子,重要的是要考虑生物效应是由多种因素共同引起的,还是由单一分子引起的。MultiStem[®]是一款骨髓来源的类 MSCs 药品,适应症是急性心肌梗死,研究者开发了基于血管再生的多重检测策略,确定了 3 个血管形成相关因子在诱导血管形成中的关键作用及诱导血管形成的最低剂量,并进行了批次间验证,提出放行标准:VEGF, CXCL5 和 IL-8 的最小浓度分别为 VEGF₁₂₁ 250 pg·mL⁻¹, VEGF₁₆₅ 25 pg·mL⁻¹, CXCL5 2 000 pg·mL⁻¹ 和 IL-8 80 pg·mL⁻¹^[88]。

确定可能有助于预测 MSCs 效力的多种因素,包括供体来源、基因表达谱、分泌组等,对多种参数进行组合也可以作为一种效力分析方法。Maughon 等^[89]测定了 MSCs 代谢组和细胞因子谱,并对核磁、质谱和细胞因子数据合并,使用偏最小二乘回归和变量投影重要性确定了一组候选代谢物和细胞因子。

5.2 先进技术的使用

新技术如组学技术、基于生物材料、芯片技术和/或基于人工智能的图形分析等为 MSCs 作用机制和效力评价研究提供了新的思路^[90]。Chinnadurai 等^[43]研究了分泌组和转录组与 T 细胞增殖的关系,发现特定分泌因子和 RNA 与 T 细胞增殖抑制作用存在剂量-反应关系。Williams 等^[91]将 MSCs 包埋在聚乙二醇水凝胶并整合到微流控芯片中,以 IFN- γ 进行灌注,一定时间后收集流出液,发现 3D 与 2D 培养的 MSCs 在 6 个分泌物上显著不同。借助人工智能和深度学习,美国 FDA 使用自动图像处理软件提取了 MSCs 的 21 个形态学特征预测 MSCs 在与 T 细胞共培养时的免疫抑制能力^[90]。

5.3 对照品和质控品

效力测定方法应包括适当的对照品和质控品,但通用细胞参考标准物应慎重选择^[92]。在可行的情况下,生产商应开发内部参考材料,包括具有良好

特征的临床批次或由生产商制备的其他具有良好特征的材料。使用静息 MSCs 作为对照,使用激活/启动 MSCs 进行测试,避免了对通用细胞参考标准物的需求,其是参考物质的补充方法。另外,还可以选择细胞的非活性形式作为参考标准。

[参 考 文 献]

- [1] FDA. Guidance for industry: potency tests for cellular and gene therapy products [EB/OL]. (2024 - 02). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/potency-tests-cellular-and-gene-therapy-products>.
- [2] EMA. Guideline on human cell-based medicinal products [EB/OL]. (2024 - 02). <https://www.ema.europa.eu/en/human-cell-based-medicinal-products>.
- [3] EMA. Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment cancer [EB/OL]. (2024 - 02). <https://www.ema.europa.eu/en/potency-testing-cell-based-immunotherapy-medicinal-products-treatment-cancer-0>.
- [4] CDE. Technical guidelines for pharmaceutical research and evaluation of human stem cell products (Trial) [EB/OL]. (2024 - 02). <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>.
- [5] KEBRIAIE P, ISOLA L, BAHCECI E, *et al.* Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(7): 804 - 811.
- [6] DALY A. Remestemcel-L, the first cellular therapy product for the treatment of graft-versus-host disease [J]. *Drugs Today*, 2012, 48(12): 773 - 783.
- [7] EMA. Alofisel. European Public Assessment Report [EB/OL]. (2024 - 03). https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [8] THEJ C, RAMADASSE B, WALVEKAR A, *et al.* Development of a surrogate potency assay to determine the angiogenic activity of Stempeucel®, a pooled, ex-vivo expanded, allogeneic human bone marrow mesenchymal stromal cell product [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 47.
- [9] GUPTA PK, DUTTA S, KALA S, *et al.* Phase IV postmarketing surveillance study shows continued efficacy and safety of Stempeucel in patients with critical limb ischemia due to Buerger's disease [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(12): 1602 - 1613.
- [10] KARP JM, LENG TEO GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 206 - 216.
- [11] NITZSCHE F, MÜLLER C, LUKOMSKA B, *et al.* Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(6): 1446 - 1460.
- [12] GUAN SP, LAM ATL, NEWMAN JP, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 facilitates MSC migration via cleavage of IGF-2/IGFBP2 complex [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(1): 15 - 26.
- [13] TANG YL, ZHU WQ, CHENG M, *et al.* Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression [J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1209 - 1216.
- [14] SHIMAMURA Y, FURUHASHI K, TANAKA A, *et al.* Mesenchymal stem cells exert renoprotection via extracellular vesicle-mediated modulation of M2 macrophages and spleen-kidney network [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 753.
- [15] LUGER D, LIPINSKI MJ, WESTMAN PC, *et al.* Intravenously delivered mesenchymal stem cells: systemic anti-inflammatory effects improve left ventricular dysfunction in acute myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2017, 120(10): 1598 - 1613.
- [16] HUANG J, HUANG WJ, YI JZ, *et al.* Mesenchymal stromal cells alleviate depressive and anxiety-like behaviors via a lung vagal-to-brain axis in male mice [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7406.
- [17] PANG SHM, D'ROZARIO J, MENDONCA S, *et al.* Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6495.
- [18] GALLEU A, RIFFO-VASQUEZ Y, TRENTO C, *et al.* Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces *in vivo* recipient-mediated immunomodulation [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(416): eaam7828.
- [19] PITTINGER MF, DISCHER DE, PÉAULT BM, *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress [J]. *NPJ Regen Med*, 2019, 4: 22.
- [20] FRANÇOIS M, ROMIEU-MOUREZ R, LI MY, *et al.* Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 187 - 195.
- [21] ERKERS T, NAVA S, YOSEF J, *et al.* Decidual stromal cells promote regulatory T cells and suppress alloreactivity in a cell contact-dependent manner [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(19): 2596 - 2605.
- [22] DE CASTRO LL, LOPES-PACHECO M, WEISS DJ, *et al.* Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(5): 605 - 618.
- [23] DAVIES LC, HELDRING N, KADRI N, *et al.* Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T cell mediated immunosuppression [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(3): 766 - 776.
- [24] CHERIAN DS, BHUVAN T, MEAGHER L, *et al.* Biological considerations in scaling up therapeutic cell manufacturing [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 654.
- [25] KOU M, HUANG L, YANG JJ, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 580.
- [26] LOUSSOUARN C, PERS YM, BONY C, *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles regulate the mitochondrial metabolism via transfer of miRNAs [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 623973.
- [27] ASGARPOUR K, SHOJAEI Z, AMIRI F, *et al.* Exosomal microRNAs derived from mesenchymal stem cells: cell-to-cell messages [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 149.
- [28] LIN RZ, IM GB, LUO AC, *et al.* Mitochondrial transfer mediates endothelial cell engraftment through mitophagy [J]. *Nature*, 2024, 629(8012): 660 - 668.
- [29] MALEKPOUR K, HAZRATI A, SOUDI S, *et al.* Mechanisms behind therapeutic potentials of mesenchymal stem cell mitochondria transfer/delivery [J]. *J Control Release*, 2023, 354: 755 - 769.
- [30] BORCHERDING N, BRESTOFF JR. The power and potential of mitochondria transfer [J]. *Nature*, 2023, 623(7986): 283 - 291.
- [31] GIACOMINI C, GRANÉLI C, HICKS R, *et al.* The critical role of apoptosis in mesenchymal stromal cell therapeutics and implications in homeostasis and normal tissue repair [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(6): 570 - 582.
- [32] GAVIN C, MEINKE S, HELDRING N, *et al.* The complement system is essential for the phagocytosis of mesenchymal stromal cells by monocytes [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2249.
- [33] GALIPEAU J, KRAMPERA M, LEBLANC K, *et al.* Mesenchymal stromal cell variables influencing clinical potency: the impact of viability, fitness, route of administration and host predisposition [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23(5): 368 - 372.
- [34] MASTROLIA I, FOPPIANI EM, MURGIA A, *et al.* Challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells: concise review [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(11): 1135 - 1148.
- [35] CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 301 - 313.
- [36] LIU HJ, LI P, ZHANG SY, *et al.* Prx1 marks stem cells for bone, white adipose tissue and dermis in adult mice [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(12): 1946 - 1958.
- [37] SHARPE PT. Dental mesenchymal stem cells [J]. *Development*, 2016, 143(13): 2273 - 2280.
- [38] LI PS, OU QM, SHI ST, *et al.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells/dental stem cells and their therapeutic

- applications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(6): 558–569.
- [39] WANG ZN, HUANG M, ZHANG Y, *et al.* Comparison of biological properties and clinical application of mesenchymal stem cells from the mesoderm and ectoderm[J]. *Stem Cells Int*, 2023, 2023: 4547875.
- [40] GLAESER JD, BEHRENS P, STEFANOVIC T, *et al.* Neural crest-derived mesenchymal progenitor cells enhance cranial allograft integration[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(5): 797–809.
- [41] WEI YL, WANG B, JIA L, *et al.* Lateral mesoderm-derived mesenchymal stem cells with robust osteochondrogenic potential and hematopoiesis-supporting ability [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 767536.
- [42] SAMSONRAJ RM, RAI B, SATHIYANATHAN P, *et al.* Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1878–1891.
- [43] CHINNADURAI R, RAJAN D, QAYED M, *et al.* Potency analysis of mesenchymal stromal cells using a combinatorial assay matrix approach[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(9): 2504–2517.
- [44] YANG YK, OGANDO CR, WANG SEE C, *et al.* Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging *in vitro*[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 131.
- [45] PAQUET J, DESCHEPPER M, MOYA A, *et al.* Oxygen tension regulates human mesenchymal stem cell paracrine functions[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(7): 809–821.
- [46] HU XY, XU YC, ZHONG ZW, *et al.* A large-scale investigation of hypoxia-preconditioned allogeneic mesenchymal stem cells for myocardial repair in nonhuman Primates: paracrine activity without remuscularization[J]. *Circ Res*, 2016, 118(6): 970–983.
- [47] JIANG RH, WU CJ, XU XQ, *et al.* Hypoxic conditioned medium derived from bone marrow mesenchymal stromal cells protects against ischemic stroke in rats[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1354–1368.
- [48] ELABD C, ICHIM TE, MILLER K, *et al.* Comparing atmospheric and hypoxic cultured mesenchymal stem cell transcriptome: implication for stem cell therapies targeting intervertebral discs[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 222.
- [49] GUESS AJ, DANEALU B, WANG RZ, *et al.* Safety profile of good manufacturing practice manufactured interferon γ -primed mesenchymal stem/stromal cells for clinical trials[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(10): 1868–1879.
- [50] KRATCHMAROVA I, BLAGOEV B, HAACK-SORENSEN M, *et al.* Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Science*, 2005, 308(5727): 1472–1477.
- [51] NG F, BOUCHER S, KOH S, *et al.* PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages [J]. *Blood*, 2008, 112(2): 295–307.
- [52] AGATA H, WATANABE N, ISHII Y, *et al.* Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 353–358.
- [53] POLCHERT D, SOBINSKY J, DOUGLAS G, *et al.* IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(6): 1745–1755.
- [54] BOLAND L, BURAND AJ, BROWN AJ, *et al.* IFN- γ and TNF- α pre-licensing protects mesenchymal stromal cells from the pro-inflammatory effects of palmitate[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(3): 860–873.
- [55] FAYYAD-KAZAN M, NAJAR M, FAYYAD-KAZAN H, *et al.* Identification and evaluation of new immunoregulatory genes in mesenchymal stromal cells of different origins: comparison of normal and inflammatory conditions[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23: 87–96.
- [56] KILLER MC, NOLD P, HENKENIUS K, *et al.* Immunosuppressive capacity of mesenchymal stem cells correlates with metabolic activity and can be enhanced by valproic acid[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 100.
- [57] KIM SH, DAS A, CHAI JC, *et al.* Transcriptome sequencing wide functional analysis of human mesenchymal stem cells in response to TLR4 ligand[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30311.
- [58] ROSOVÁ I, DAO M, CAPOCCIA B, *et al.* Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(8): 2173–2182.
- [59] DAS B, BAYAT-MOKHTARI R, TSUI M, *et al.* HIF-2 α suppresses p53 to enhance the stemness and regenerative potential of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(8): 1685–1695.
- [60] MO MH, ZHOU Y, LI S, *et al.* Three-dimensional culture reduces cell size by increasing vesicle excretion[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(2): 286–292.
- [61] BARTOSH TJ, YLÖSTALO JH, BAZHANOV N, *et al.* Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1) [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2443–2456.
- [62] SHAKOURI-MOTLAGH A, O'CONNOR AJ, BRENNECKE SP, *et al.* Native and solubilized decellularized extracellular matrix: a critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells[J]. *Acta Biomater*, 2017, 55: 1–12.
- [63] ENGLER AJ, SEN S, SWEENEY HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677–689.
- [64] MURPHY WL, MCDEVITT TC, ENGLER AJ. Materials as stem cell regulators[J]. *Nat Mater*, 2014, 13(6): 547–557.
- [65] LEONG WS, WU SC, PAL M, *et al.* Cyclic tensile loading regulates human mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like phenotype[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(Suppl 3): S68–S79.
- [66] FRANÇOIS M, COPLAND IB, YUAN SL, *et al.* Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(2): 147–152.
- [67] HOOGDUIJN MJ, LOMBARDO E. Mesenchymal stromal cells anno 2019: dawn of the therapeutic era? concise review [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(11): 1126–1134.
- [68] TEERLINK JR, METRA M, FILIPATOS GS, *et al.* Benefit of cardiopoietic mesenchymal stem cell therapy on left ventricular remodelling: results from the Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) study [J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(11): 1520–1529.
- [69] BARTOLUCCI J, VERDUGO FJ, GONZÁLEZ PL, *et al.* Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: a phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]) [J]. *Circ Res*, 2017, 121(10): 1192–1204.
- [70] HOBAN DB, HOWARD L, DOWD E. GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2015, 303: 402–411.
- [71] KADRI N, AMU S, IACOBAEUS E, *et al.* Current perspectives on mesenchymal stromal cell therapy for graft versus host disease [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(6): 613–625.
- [72] GAVIN C, BOBERG E, VON BAHR L, *et al.* Tissue immune profiles supporting response to mesenchymal stromal cell therapy in acute graft-versus-host disease-a gut feeling[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 334.
- [73] CHEUNG TS, BERTOLINO GM, GIACOMINI C, *et al.* Mesenchymal stromal cells for graft versus host disease: mechanism-based biomarkers[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1338.
- [74] GALIPEAU J, KRAMPRA M, BARRETT J, *et al.* International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(2): 151–159.
- [75] HANSEN SB, HØJGAARD LD, KASTRUP J, *et al.* Optimizing

- an immunomodulatory potency assay for Mesenchymal Stromal Cell[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1085312.
- [76] DE WOLF C, VAN DE BOVENKAMP M, HOEFNAGEL M. Regulatory perspective on *in vitro* potency assays for human mesenchymal stromal cells used in immunotherapy[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(7): 784 – 797.
- [77] RIBEIRO A, RITTER T, GRIFFIN M, *et al.* Development of a flow cytometry-based potency assay for measuring the *in vitro* immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells[J]. *Immunol Lett*, 2016, 177: 38 – 46.
- [78] GALIPEAU J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: the emerging role of chemokine cooperativity[J]. *Stem Cells*, 2021, 39(9): 1145 – 1154.
- [79] HAMCZYK MR, VILLA-BELLOSTA R, ANDRÉS V. *In vitro* macrophage phagocytosis assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1339: 235 – 246.
- [80] GUAN QD, LI Y, SHPIRUK T, *et al.* Inducible indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 and programmed death ligand 1 expression as the potency marker for mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(5): 639 – 649.
- [81] 纳涛, 王盼, 刘静, 等. 基于吡啶胺 2, 3-双加氧酶 1 活性评价人间充质干细胞免疫调控功能的吸光光度法的建立及优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(9): 954 – 960.
- [82] LEE RH, YU JM, FOSKETT AM, *et al.* TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): 16766 – 16771.
- [83] KOTA DJ, PRABHAKARA KS, TOLEDANO-FURMAN N, *et al.* Prostaglandin E2 indicates therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(5): 1416 – 1430.
- [84] SHERMAN SE, KULJANIN M, COOPER TT, *et al.* High aldehyde dehydrogenase activity identifies a subset of human mesenchymal stromal cells with vascular regenerative potential[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(6): 1542 – 1553.
- [85] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, *et al.* Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 425 – 532.
- [86] IQBAL F, SZARAZ P, LIBRACH M, *et al.* Angiogenic potency evaluation of cell therapy candidates by a novel application of the *in vitro* aortic ring assay[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 184.
- [87] BRENNEN WN, NGUYEN H, DALRYMPLE SL, *et al.* Assessing angiogenic responses induced by primary human prostate stromal cells in a three-dimensional fibrin matrix assay[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71298 – 71308.
- [88] LEHMAN N, CUTRONE R, RABER A, *et al.* Development of a surrogate angiogenic potency assay for clinical-grade stem cell production[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(8): 994 – 1004.
- [89] MAUGHON TS, SHEN XN, HUANG DN, *et al.* Metabolomics and cytokine profiling of mesenchymal stromal cells identify markers predictive of T-cell suppression[J]. *Cytotherapy*, 2022, 24(2): 137 – 148.
- [90] KLINKER MW, MARKLEIN RA, LO SURDO JL, *et al.* Morphological features of IFN- γ -stimulated mesenchymal stromal cells predict overall immunosuppressive capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(13): E2598 – E2607.
- [91] WILLIAMS EK, GARCÍA JR, MANNINO RG, *et al.* Enabling mesenchymal stromal cell immunomodulatory analysis using scalable platforms[J]. *Integr Biol*, 2019, 11(4): 154 – 162.
- [92] 王自强, 王灿, 厉高慙, 等. CAR-T 细胞治疗产品体外效力的检测策略与技术进展[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(18): 1837 – 1842.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2024-11-10