

间充质干细胞对外周血单个核细胞增殖抑制的影响因素

廖霞¹, 吴建福¹, 罗志勇¹, 王丹^{2,3}, 戴希城¹, 唐开¹, 潘兴华¹, 张芬¹, 梁晓¹

(1. 深圳市北科生物科技有限公司, 深圳 518067; 2. 深圳科诺医学检验实验室, 深圳 518055; 3. 细胞产业关键共性技术国家工程研究中心, 深圳 518071)

摘要: 为系统探究间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)对 PBMC 增殖抑制的影响因素, 建立标准化评估体系, 采用第四代脐带 MSC 进行细胞形态、细胞表面标志物和三系分化鉴定。将 MSC 与 PHA-P 诱导的 PBMC 进行直接接触共培养, 通过 CFSE 标记结合流式细胞术检测增殖抑制率, 分析 PBMC 来源、MSC : PBMC 比例、刺激剂浓度、培养时间及 MSC 预处理等因素的影响。研究用 MSC 经形态、细胞表面标志物和三系分化鉴定, 符合标准 MSC 要求。MSC 对 PBMC 增殖抑制率随 MSC : PBMC 比例降低而下降, 符合剂量依赖规律。单一来源 PBMC 较混合来源 PBMC 的抑制率更高, 提示同种异源细胞间相互作用可能干扰结果。增殖率随时间和刺激剂浓度增加而上升, 需平衡至适宜范围以凸显 MSC 抑制效应。IFN- γ 诱导可增强 MSC 抑制能力, 表明细胞预处理有望优化检测方法。MSC 对 PBMC 增殖抑制效果受 PBMC 来源、MSC 类型、MSC : PBMC 比例、PHA-P 浓度、共培养天数影响。该研究通过验证各因素对 MSC 抑制 PBMC 增殖的影响, 基于多维度实验数据的归纳总结, 为 MSC 免疫调控功能的质量评价提供了研究基础。

关键词: 间充质干细胞; 外周血单个核细胞; 免疫调控; 增殖抑制; 生物学有效性; 质量评价

中图分类号: R392.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2026)03-0386-09

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)作为当前细胞治疗领域的核心产品, 其临床转化应用面临着严格的质量控制挑战。根据《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》要求, MSC 需满足生物学特征、安全性和生物学有效性等多维质量标准^[1-2]。其中, 生物学有效性评估作为预测临床疗效的关键环节, 已成为细胞治疗产品从实验室走向临床的技术瓶颈^[3]。MSC 的免疫调节功能是其生物学有效性的重要体现, 通过接触抑制和旁分泌机制对免疫细胞网络发挥调控作用, 在自身免疫性疾病、器官移植排斥等疾病治疗中展现出独特优势^[4-5]。体外抑制 PBMC 增殖是目前公认的 MSC 免疫调节能力评价方法^[6]。然而, 该方法在实际应用中面临显著的标准化难题: 一方面, MSC 来源于异质细胞群, 供体差异导致不同批次细胞的免疫调控能力呈现显著异质性^[7-8]; 另一方面, 现有检测体系中刺激剂浓度、培养时间、细胞共培养比例等参数缺乏统一标准, 各实验室间数据可比性差^[9]。例如, 研究表明不同供体来源的 MSC

对 PBMC 增殖的抑制率差异可达 40%~70%^[10], 这种差异既可能源于细胞本身的生物学特性, 也可能与检测方法的参数设置相关。尽管大量研究已证实 MSC 对 PBMC 的增殖抑制作用^[11-13], 但针对检测方法影响因素的系统性研究仍显不足。现有文献多聚焦于单一因素分析, 如 MSC 来源或共培养比例的影响, 缺乏多维度参数的综合评估^[14]。此外, 同种异源细胞相互作用对检测结果的干扰机制尚未明确, 混合来源 PBMC 在免疫应答中的复杂性可能导致 MSC 抑制效应的误判^[15]。更重要的是, 如何通过细胞预处理(如细胞因子诱导)优化检测灵敏度, 仍是该领域亟待解决的科学问题^[16]。鉴于上述现状, 本研究旨在系统探究 MSC 体外抑制 PBMC 增殖的关键影响因素, 建立多维度的试验评估体系。通过分析 PBMC 来源、MSC : PBMC 比例、刺激剂浓度、共培养时间等参数对抑制效应的影响规律, 为 MSC 免疫调控功能的标准化质量评价提供依据, 进而推动 MSC 细胞治疗产品的临床转化进程。研究成果将为《干细胞临床研究管理办法》中生物学有效性评价体系的完善提供重要参考^[1], 并为免疫相关疾病的细胞治疗药物筛选建立可靠的体外评估模型。

收稿日期: 2025-06-19

作者简介: 廖霞(1997—), 女, 硕士生, 助理研究员, 主要从事间充质干细胞质量检测与评价方向的研究。

通信作者: 梁晓(E-mail: szjiance@beike.cc)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与设备 FBS(23020705)购自杭州四季青; Advanced RPMI 1640 培养液(2683396)购自 Thermo; PHA-P(3230815003)、CFSE(0230211)购自 solarbio; 7-AAD(2348194)购自 BD; PBS(J414KA9041)购自生工; 无血清基础培养液(05-200-1A)、无血清营养添加物(05-201-1U)购自 Sartorius; 血小板裂解物(PLTGOLD050GMP)购自 Biological Industries; FITC-CD90(555595)、PE-CD73(550257)、APC-CD105(562408)、FITC-CD45(555482)、PE-CD34(550761)、FITC-CD14(655714)、APC Mouse Anti-Human CD79a(551134)、Anti-HLA-DR-PerCP(347364)、FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control(555748)、PE Mouse IgG1, κ Isotype Control(555749)、APC Mouse IgG1, κ Isotype Control(555751)、Mouse IgG2a-PerCP(349054)购自 BD; CD29 Monoclonal Antibody, APC, eBioscience™(17-0299-42)购自 Thermo。生物安全柜(ESCO AC2-4S1)购自 ESCO; 流式细胞仪(BD Lyrice™)购自 BD; 台式离心机(2420)购自久保田; 倒置显微镜(DMILLED)购自 Leica; CO₂ 培养箱(HERAcell 150i240i)购自 Thermo; 细胞计数仪(Cellometer Auto 2000)购自 Nexcelom; 药品保存箱(DW-86W420)购自海尔。

1.2 方法

1.2.1 MSC 制备 足月顺产的健康产妇捐献的新生儿脐带(同一新生儿脐带来源, 捐献者签署知情同意书), 无菌条件下取脐带 15~20 cm。HBV、HCV、人类免疫缺陷病毒及 EB 病毒化验结果全部阴性。新生儿脐带离体后放置在 50 mL 的无菌 PBS 中浸泡。取出脐带充分接触 0.5% 碘伏消毒后, 洗净, 将脐带剪成小段, 排净血液, 将华通氏胶从羊膜上剥离下来, 将洗涤后华通氏胶胶体剪切组织匀浆块, 定容至 45 mL 摇匀, 离心, 将胶体和胶原酶溶液按 1:2 的比例进行混匀, 37℃ 震荡消化 3 h, 将消化完成后的组织匀浆块与复方氨电解质注射液按 1:5 的比例在 T175 瓶中进行稀释, 形成悬液。将悬液通过细胞滤网过滤后离心, 用 10 mL 完全培养液重悬, 得到备用的细胞悬液, 淋巴细胞增殖抑制试验采用第四代 MSC 进行共培养。

1.2.2 PBMC 制备 新鲜外周血的采集经过医学

伦理委员会的批准意见, 取适量健康供者新鲜外周血离心, 将离心后的上清液转移到 50 mL 离心管中, 生理盐水定容至 30 mL, 将稀释后的细胞铺到分离液管, 每管添加 15 mL Ficoll 进行铺层, 保持分离液与稀释血液界面清晰, 离心缓慢沉降。离心后, 吸取 PBMC 层使用生理盐水定容, 混匀后离心弃上清, 将细胞沉淀合并, 并使用生理盐水重悬混匀, 取样进行细胞数量和存活率检测。加冻存液后细胞存放于 -150℃ 以下, 使用前经 37℃ 水浴复苏使用。

1.2.3 MSC 鉴定 将研究用 MSC 在显微镜下观察形态; 将培养获得的 MSC 消化制备成单细胞悬液, 流式细胞术检测细胞表面标志物 CD105、CD73 和 CD90、CD29、CD45、CD34、CD14、CD79a 和 HLA-DR; 三系分化检测 MSC 成骨分化、成脂分化和成软骨分化的性能。

成骨分化检测: 细胞融合度达到 70%~80% 时吸出分化组的完全培养液, 每孔加入 1 mL 成骨分化诱导液, 间隔 2~3 d 进行半量换液, 对照组在接种的第 10 天进行半量换液, 间隔 2~3 d 进行半量换液, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 18~21 d, 显微镜下观察到有黑灰色钙结节时用 2% 茜素红染色。

成脂检测: 对照组在接种的第 10 天进行半量换液, 间隔 2~3 d 进行半量换液; 细胞融合度达到 95%~100% 时吸出分化组的完全培养液, 每孔加入 1 mL 脂 A 诱导液, 3 d 后分化组更换为脂 B 诱导液, 24 h 后换回 A 液, A 液和 B 液交替作用 3~5 次后(12~20 d), 继续用 B 液培养 4~7 d 后, 待脂滴变大用油红 O 进行染色。

成软骨分化检测: 用生理盐水将待检细胞洗涤离心, 用完全培养液重悬并取样计数, 分化组和对照组各设 2 支 15 mL 离心管, 每支离心管接种 4×10^5 个细胞, $300 \times g$ 离心 5 min 后吸去上清, 分化组更换为 0.5 mL 软骨分化预混液, 对照组更换为 0.5 mL 完全培养液, 再次离心后吸去分化组上清, 更换为 0.5 mL 软骨分化诱导液并进行离心, 对照组离心后无需操作。将离心后的分化组和对照组置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱, 24 h 后观察样本是否成球, 成球后每隔 2~3 d 进行全量换液, 诱导 21~28 d 后对软骨球进行多聚甲醛固定和石蜡包埋切片, 最后进行阿利辛蓝染色。

1.2.4 PBMC 增殖抑制试验 取试验用 MSC, 重悬于 MSC 完全培养液中, 细胞计数后依据接种比

例取适量细胞悬液于培养液中,混匀后接种至 24 孔板,每孔 1 mL,接种 3 个复孔;MSC 接种后于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 至细胞贴壁。

按照 PBMC 悬液体积 (5 mmol/L CFSE = 1 000 : 1),取出相应数量的 CFSE 加入 PBMC 悬液,使得 CFSE 终浓度为 5 μmol/L,37 ℃避光孵育 10 min 标记细胞;孵育完成后加入 5 倍的 RPMI 1640 完全培养液,置于 2~8 ℃药品保存箱避光孵育 5 min,中和游离的 CFSE;使用 RPMI 1640 完全培养液洗涤细胞 2 次 (500×g, 3 min 离心),洗去多余染料,重悬后计数;待 MSC 细胞贴壁后,弃掉原先的 MSC 完全培养液,向阴性对照组、阳性对照组、试验组中接种 CFSE 染色后的 PBMC;接种 PBMC 密度为 3×10⁵ 个/孔。向接种孔中阴性对照组补充 RPMI 1640 完全培养液至每孔 1 mL;取适量 RPMI 1640 完全培养液加相应比例 PHA-P,使得 PHA-P 终浓度为 6~10 μg/mL,向阳性对照组和试验组补充含 PHA-P 的 RPMI 1640 完全培养液至每孔 1 mL 进行细胞刺激与活化。将上述接种细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱避光培养适宜天数。

培养完成后,将孔板取出,并使用 1 mL PBS

洗涤孔板,并将对应液体转移至流式管内,500×g 离心 3 min;弃上清,使用 PBS 100 μL 重悬细胞,加入 5 μL 7-AAD,2~8 ℃避光孵育 10 min;孵育完成后加入 PBS 1 mL,500×g 离心 3 min,弃上清,重复 2 遍,洗涤细胞;弃上清,加入 PBS 300 μL,上机检测。统计分析阳性对照组、试验组的各增殖代数细胞比例总和,复孔结果取平均值进行计算;阴性对照组结果不需要统计。

增殖抑制率计算:抑制率=(P 增殖量- T 增殖量)/P 增殖量×100%,其中 P 增殖量为阳性对照组 PBMC 增殖代数细胞比例之和, T 增殖量为 MSC 试验组 PBMC 增殖代数细胞比例之和。

增殖率统计:流式细胞术检测 CFSE 标记的 PBMC 增殖代数,统计各代细胞比例总和。

1.2.5 MSC 在不同比例下对不同来源的 PBMC 增殖抑制率的影响 研究用混合来源 PBMC 为 3 个不同供者 PBMC 1 : 1 : 1 混合而得,单一来源为其中 1 个供者的 PBMC。刺激剂 PHA-P 浓度为 8 μg/mL (可增强 PBMC 对刺激的响应性,确保在变量波动时仍能稳定检测到 MSC 的抑制作用),培养时间为 4 d,设置 3 个不同 MSC : PBMC 组 (1 : 5、1 : 10、1 : 20),每组设置 3 复孔,检测参数见表 1。

表 1 MSC 和 PBMC 共培养的分组

组别	PBMC/个	PHA-P/(μg · mL ⁻¹)	MSC/个
阴性对照组	3×10 ⁵	0	0
阳性对照组	3×10 ⁵	6~10	0
MSC : PBMC 共培养组			
1 : 5	3×10 ⁵	6~10	6.0×10 ⁴
1 : 10	3×10 ⁵	6~10	3.0×10 ⁴
1 : 20	3×10 ⁵	6~10	1.5×10 ⁴

1.2.6 不同 MSC 细胞类型在不同比例下对 PBMC 增殖抑制率的影响 设置刺激剂 PHA-P 浓度为 6 μg/mL (避免过度刺激导致的“增殖天花板效应”,更易区分不同细胞类型对抑制率的影响),培养时间为 5 d, PBMC 为单一来源,空白对照组,未经处理, IFN-γ 诱导组经 12.5 ng/mL IFN-γ 诱导处理 24 h 的试验组,以比较不同细胞种类的增殖抑制率。同时设置 3 个不同 MSC : PBMC 试验组 (1 : 5、1 : 10、1 : 20),每组设置 3 复孔,检测参

数见表 1。

1.2.7 不同培养天数对 PBMC 增殖量的影响 设置刺激剂 PHA-P 浓度为 8 μg/mL (可增强 PBMC 对刺激的响应性,确保在变量波动时仍能稳定检测到 MSC 的抑制作用),培养时间为 3、4、5 d, PBMC 为单一来源。每组设置 3 复孔,检测参数见表 1。

1.2.8 不同浓度刺激剂对 PBMC 增殖量的影响 设置刺激剂 PHA-P 浓度为 6、8 和 10 μg/mL,培养时间为 4 d, PBMC 为单一来源, MSC : PBMC 比例为 1 : 5。每组设置 3 复孔,检测参数见表 1。

1.3 统计学处理 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 反映数据集中趋势和离散程度。每组设置 3 个复孔, 计算复孔平均值, 确保数据重复性。数据分析及统计在 Graphpad Prism 中处理, 两组间比较采用 Students t 检验; 3 组间比较采用方差分析; 检验水准(α)为 0.05。通过对比不同组别(如单一来源与混合来源 PBMC、不同 MSC : PBMC 比例、不同培养天数等)的增殖抑制率或增殖量, 分析各因素对结果的影响。

2 结果

2.1 MSC 的形态 采用形态贴壁培育法培养初代组织, 细胞呈梭形或三角形, 分散于整个培养皿中, 平铺生长。MSC 在经过 2 代培养后, 细胞为长梭形, 整体为旋涡状, 显微镜下观察细胞纯净均一, 数量丰富。详见图 1。

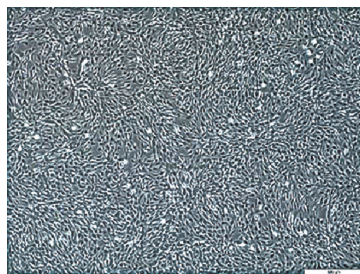


图 1 显微镜下 MSC 细胞形态学观察($\times 40$)

2.2 MSC 表面标志物的表达 结果表明, MSC 阳性标志物 CD90、CD73、CD105 和 CD29 的表达率分别为 99.95%、98.42%、99.97% 和 99.97%; 阴性标志物 CD45、CD34、CD79a、CD14 和 HLA-DR 的表达率分别为 0.22%、1.09%、0.93%、0.08% 和 0.84%。以上数据说明本研究制备的 MSC 具有标准细胞株的表面标志物特性。详见图 2。

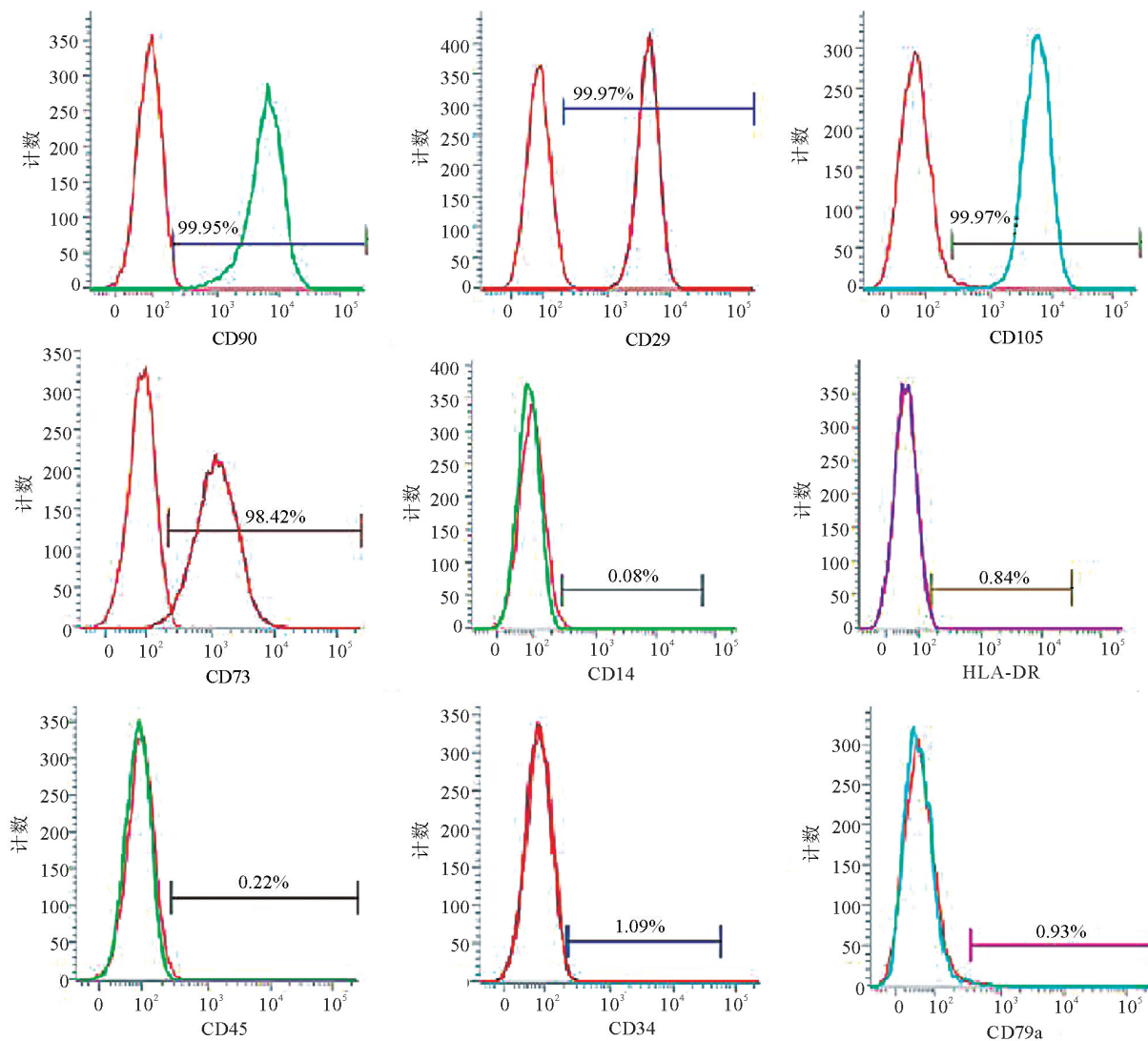


图 2 MSC 表面标志物的表达图谱

2.3 MSC 三系分化结果 MSC 经培养, 成脂分化后有脂肪滴生成, 油红染色呈红色; 成骨分化后有矿化结节生成, 茜素红染色后呈红色; 软骨分化后

有软骨球生成, 阿利辛蓝染色后, 软骨球呈深蓝色, 结果表明本研究制备的 MSC 具有标准细胞株的三系分化潜能。详见图 3。

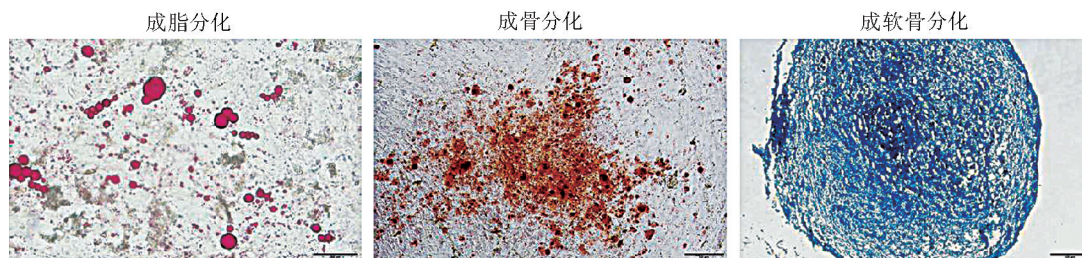


图 3 MSC 三系分化结果(成脂分化 $\times 400$, 成骨分化 $\times 100$, 成软骨分化 $\times 200$)

2.4 MSC 对 PBMC 增殖的影响 PBMC 每分裂增殖 1 代, 荧光强度减半, 表现为结果图上的 1 个尖峰, 代表为 1 个分裂代次。结果图上可以看出, 相比于加了刺激剂的阳性对照组, 加入 MSC 后 CFSE 阴性细胞数减少, MSC 有效抑制了 PBMC 增殖。

显微镜下发现阴性对照组的 PBMC 不增殖, 阳性对照组的 PBMC 增殖迅猛且聚集成团, 试验组的 PBMC 与 MSC 共培养下, PBMC 数量较阳性对照组减少, 说明 MSC 有效抑制了 PBMC 增殖。详见图 4。

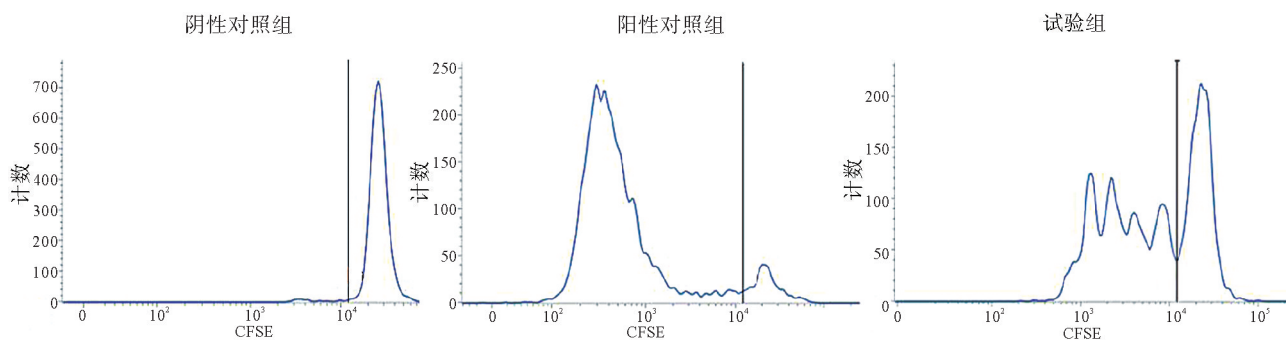


图 4 流式细胞术检测 MSC 对 PBMC 增殖的影响

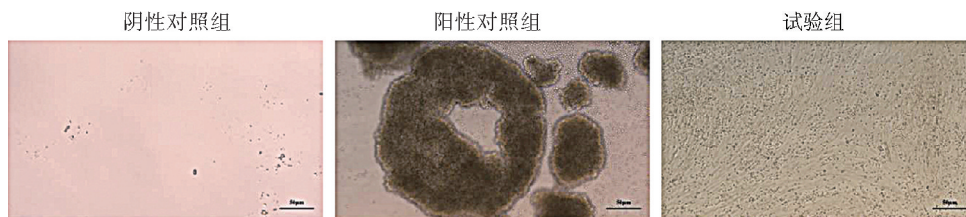


图 5 显微镜下观察 MSC 对 PBMC 增殖的影响($\times 100$)

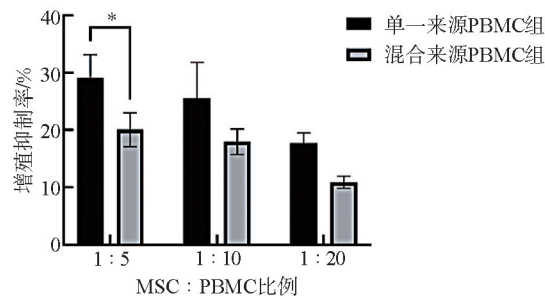
2.5 MSC 在不同比例下对不同来源的 PBMC 增殖抑制率的影响 当培养天数为 4 d 时, MSC 与单一来源 PBMC 的比例为 1 : 5、1 : 10 和 1 : 20 时, 增殖抑制率分别为 $(29.12 \pm 4.08)\%$ 、 $(25.57 \pm 6.25)\%$ 和 $(17.7 \pm 1.86)\%$, 符合预期, 抑制率下降, 呈剂量依赖趋势。MSC 与混合来源 PBMC 的比例为 1 : 5、1 : 10 和 1 : 20 时, 增殖抑制率分别为 $(20.06 \pm 2.96)\%$ 、 $(17.96 \pm 2.23)\%$ 和 $(10.89 \pm 1.04)\%$, MSC 对 PBMC 增殖抑制率随 MSC :

PBMC 比例降低而下降, 符合剂量依赖规律。复孔间 $CV < 15\%$, 数据较稳定。MSC : PBMC 比例为 1 : 5 时, 单一来源 PBMC 和混合来源 PBMC 的增殖抑制率存在显著差异 ($P < 0.05$)。对比单一来源 PBMC 和混合来源 PBMC 的增殖抑制率可以发现, 单一来源 PBMC 较混合来源 PBMC 的抑制率更高, 提示同种异源细胞间相互作用可能干扰结果, 导致 PBMC 增殖抑制率较低。详见表 2、图 6。

表 2 MSC 在不同比例下对不同来源的 PBMC 增殖抑制率

组别	平均值/%	CV/%	增殖抑制率/%
单一来源 PBMC 组			
1 : 5	59.28±3.41	5.75	29.12±4.08
1 : 10	62.25±5.22	8.39	25.57±6.25
1 : 20	68.83±1.55	2.25	17.70±1.86
混合来源 PBMC 组			
1 : 5	69.90±2.59	3.70	20.06±2.96
1 : 10	71.74±1.95	2.72	17.96±2.23
1 : 20	77.92±0.91	1.16	10.89±1.04

注：单一来源 PBMC 组的阳性对照平均值为(83.63±1.36)%；混合来源 PBMC 组的阳性对照平均值为(87.45±1.81)%。



注：* $P < 0.05$ 。

图 6 MSC 在不同比例下对不同来源 PBMC 的增殖抑制率

2.6 不同 MSC 细胞类型在不同比例下对 PBMC 增殖抑制率的影响 结果显示, 3 个不同 MSC : PBMC 比例下的 IFN- γ 诱导组的 PBMC 增殖抑制率均高于空白对照组, 说明不同类型细胞的免疫调

控能力不同, IFN- γ 诱导可增强 MSC 抑制能力; MSC 与 PBMC 的比例为 1 : 5、1 : 10、1 : 20 时, 抑制率随 MSC : PBMC 比例降低而下降, 符合剂量依赖规律。详见、图 7、表 3。

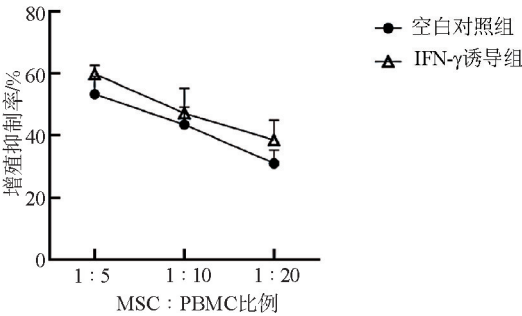


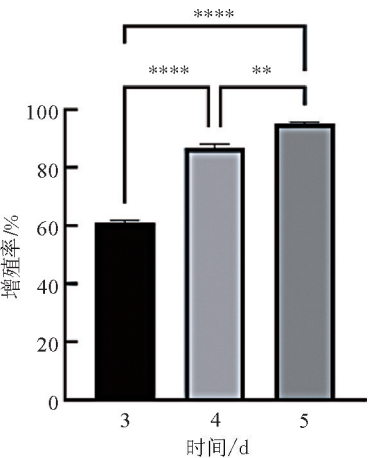
图 7 不同 MSC 细胞类型对 PBMC 的增殖抑制率

表 3 不同 MSC 细胞类型在不同比例下对 PBMC 增殖抑制率

组别	MSC : PBMC 比例		
	1 : 5	1 : 10	1 : 20
空白对照组	53.30±5.74	43.53±5.55	30.99±4.32
IFN- γ 诱导组	59.86±2.78	47.18±8.00	38.49±6.48

2.7 不同培养天数对 PBMC 增殖率的影响 由不同培养天数对 PBMC 增殖率结果可知, 在刺激剂 PHA-P 浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 时, 培养至第 3、4、5 天, 单一来源 PBMC 分别为(60.89±1.66)%、(66.65±1.79)%和(86.69±2.32)%。当 PBMC 增殖率过低时, 它还未完全增长起来, MSC 可充分抑制 PBMC 的增殖, 当 PBMC 增殖率过高时, PBMC 增殖迅猛, 无法较明显的体现 MSC 抑制 PBMC 增殖的能力。因此选择适宜的培养天数, 尤为重要。详见图 8、表 4。

2.8 不同浓度刺激剂 PHA-P 对 PBMC 增殖率的影响 阳性对照组经 PHA-P 刺激 4 d 后, PBMC 增



注：** $P < 0.01$, *** $P < 0.000 1$ 。

图 8 不同培养天数对 PBMC 增殖率的影响

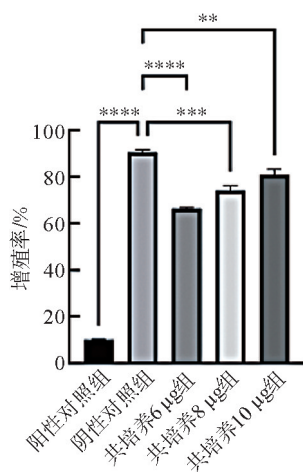
殖率为 $(90.3 \pm 2.26)\%$ ，在 PBMC 与 MSC 共培养过程中，在 6、8 和 $10\ \mu\text{g/mL}$ 的刺激剂 PHA-P 作用下，PBMC 增殖率分别为 $(66.31 \pm 0.87)\%$ 、 $(73.95 \pm 3.97)\%$ 和 $(80.79 \pm 4.16)\%$ ，呈上升趋势，3 个共培养组与阳性对照组存在显著性差异，说明 MSC 可抑制 PBMC 增殖，随着刺激剂浓度的升高，抑制作用减弱，因此需要摸索适宜的刺激剂浓度。详见图 9、表 5。

表 4 不同培养天数对 PBMC 增殖率的影响

组别	增殖率/%	CV/%
第 3 天	60.89 ± 1.66	2.73
第 4 天	86.69 ± 2.32	2.68
第 5 天	95.17 ± 0.73	0.76

表 5 不同浓度刺激剂对 PBMC 增殖率的影响

分组	增殖率/%	CV/%
阴性对照组	10.15 ± 0.40	2.50
阳性对照组	90.30 ± 2.26	1.31
共培养 $6\ \mu\text{g}$ 组	66.31 ± 0.87	5.37
共培养 $8\ \mu\text{g}$ 组	73.95 ± 3.97	5.15
共培养 $10\ \mu\text{g}$ 组	80.79 ± 4.16	2.50



注：** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$

图 9 不同浓度刺激剂对 PBMC 增殖率的影响

3 讨论

本研究通过系统探究 MSC 体外抑制 PBMC 增殖的关键影响因素，建立了多维度的试验评估体系。研究结果表明，MSC 的免疫调控效应受细胞互作比例、微环境参数及细胞来源等多重因素影响，为 MSC 免疫功能的标准化评价提供了重要试验依据。

本研究证实 MSC 对 PBMC 的增殖抑制率随 MSC : PBMC 比例降低呈梯度下降，当比例从 1 : 5 降至 1 : 20 时，单一来源 PBMC 的抑制率从 29.12% 降至 17.70%，混合来源 PBMC 从 20.06% 降至 10.89%，呈现显著的剂量依赖规律。这种效应可能与 MSC 旁分泌因子的浓度梯度相关，高比例下 MSC 分泌的 TGF- β 、吲哚胺 2,3-双加氧酶等免疫抑制分子可更有效地抑制 PBMC 活化^[14]。该发现与 Ketterl 等^[7]提出的“MSC 免疫调节能力呈细胞数量依赖性”理论一致，提示在质量评价中需严格控制共培养比例参数。本研究发现单一来源 PBMC 的增殖抑制率显著高于混合来源 PBMC，这一结果可能与混合来源 PBMC 的天然特性相关：混合来源 PBMC 来自不同个体，其相互作用可触发混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR)，通过抗原识别、共刺激分子激活等途径增强 T 细胞的基础增殖活性。较高的基础增殖水平可能降低 MSC 对其的相对抑制率，提示在 MSC 免疫调控功能评价中，PBMC 的来源 (单一/混合) 需作为关键变量加以控制，以避免 MLR 对结果的干扰。这一现象与 Levy 等^[15]提出的“PBMC 供体差异可放大试验误差”观点相印证，提示在标准化检测中应优先使用单一来源 PBMC 以降低背景干扰。培养时间与刺激剂浓度对 PBMC 增殖率的调控呈现协同作用：培养 3~5 d 内增殖率从 60.89% 升至 96.33%，刺激剂浓度 6~ $10\ \mu\text{g/mL}$ 时增殖率从 66.31% 升至 80.79%。过高的增殖背景会削弱 MSC 抑制效应的显著性，而增殖不足则无法体现免疫调控能力。这一结果支持 Hansen 等^[9]提出的“需在 PBMC 适度活化状态下评估 MSC 功能”的观点，为确定最佳检测参数提供了数据支撑。

本研究虽系统分析了体外检测的关键影响因素，但仍存在以下局限：仅采用直接接触共培养体系，未探讨旁分泌机制的独立作用；未涉及 Th1/Th17/Treg 等特定免疫细胞亚群的动态变化。后续研究可结合 Transwell 培养系统与单细胞测序技术，深入解析 MSC 与 PBMC 的分子互作网络^[17]。此外，检测体系中引入 TNF- α 等细胞因子分泌水平的定量分析，可从功能层面完善 MSC 免疫调控的评价维度^[18]。另外，比较不同供体 MSC 的抑制能力差异及其与供体特性的关联，是评估 MSC 批次间一致性的重要方面，这将是未来研究或质量控制应用中的重要环节。本研究主要聚焦于 PBMC

来源、共培养比例、刺激剂浓度、培养时间及 MSC 预处理(IFN- γ)等因素的影响,以建立标准化的检测体系,未进行不同供体 MSC 的抑制能力差异比较,也是本研究的局限之一。

本研究通过多维度试验证实, MSC 对 PBMC 的增殖抑制效应受细胞互作比例、PBMC 来源、培养时间、刺激剂浓度及 MSC 预处理状态的显著影响。研究成果为《干细胞制剂质量控制指导原则》中生物学有效性评价模块提供了试验依据,特别是在剂量依赖关系、异源细胞干扰机制及预处理优化策略等方面形成了创新性认识。未来需在多中心研究中进一步验证这些参数的普适性,推动 MSC 免疫调控功能检测的标准化进程,为细胞治疗产品的临床转化奠定关键技术基础。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 干细胞临床研究管理办法(试行)[EB/OL]. 2015, [2025-06-01]. <https://www.nhc.gov.cn/qijys/c100016/201508/cd1cb345d65d47dcadefb9c501ca5f2c.shtml>.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. 2015, [2025-06-01] <https://www.nhc.gov.cn/qijys/c100016/201508/f0381d0509e34e3db5f1ad52de0c2ea2.shtml>.
- [3] 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, (21): 2511-2518.
- [4] 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, (3): 283-290, 296.
- [5] Zaripova LN, Midgley A, Christmas SE, *et al.* Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of autoimmune and autoinflammatory diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16040.
- [6] 孙尔维, 袁小澎, 罗宇维, 等. CFSE 标记的淋巴细胞增殖实验检测方法的建立[J]. 广东医学, 2008, (10): 1626-1628.
- [7] Ketterl N, Bracht G, Schuh C, *et al.* A robust potency assay highlights significant donor variation of human mesenchymal stem/progenitor cell immune modulatory capacity and extended radio-resistance[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 236.
- [8] 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.
- [9] Hansen SB, Højgaard LD, Kastrup J, *et al.* Optimizing an immunomodulatory potency assay for mesenchymal stromal cell[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1085312.
- [10] 刘梦婷, 饶巍, 韩兵, 等. 人脐带间充质干细胞的体外免疫调节特性[J]. 中国组织工程研究, 2020, (7): 1063-1068.
- [11] 陈达兵. 骨髓间充质干细胞(BMSCs)促进移植后造血重建及免疫调控的实验研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2022.
- [12] 张思齐. 人脂肪源性血管外膜细胞与骨髓间充质干细胞对外周血 T 淋巴细胞免疫调节作用的比较[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2023.
- [13] 张晶晶, 石亚楠. 人脐带源间充质干细胞对心力衰竭患者 PBMC 增殖能力的影响[J]. 中国现代药物应用, 2018, (6): 219-220.
- [14] Mönch D, Reinders MEJ, Dahlke MH, *et al.* How to make sense out of 75, 000 mesenchymal stromal cell publications? [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1419.
- [15] Levy O, Kuai R, Siren EMJ, *et al.* Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(30): eaba6884.
- [16] 王思博, 吴涛, 庞春艳, 等. 脐带间充质干细胞对干燥综合征患者外周血的免疫调控研究[J]. 包头医学院学报, 2024, (2): 28-31, 48.
- [17] 刘珂, 杜景霞, 阮林海. 急性白血病患者 MSC 的免疫原性及抑制异体 T 淋巴细胞增殖功能和机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(7): 1056-1059.
- [18] Galipeau J, Krampera 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.

Factors regulating the inhibitory effect of mesenchymal stem cells on peripheral blood mononuclear cell proliferation

LIAO Xia¹, WU Jianfu¹, LUO Zhiyong¹, WANG Dan^{2,3}, DAI Xicheng¹, TANG Kai¹, PAN Xinghua¹, ZHANG Fen¹, LIANG Xiao¹ (1. *Shenzhen Beike Biotechnology Co., LTD., Shenzhen 518067, China*; 2. *Shenzhen Kono Laboratory of Medical Laboratory, Shenzhen 518055, China*; 3. *National Engineering Research Center of Key Generic Technologies for Cell Industry, Shenzhen 518071, China*)

Abstract: To systematically explore the regulatory factors of mesenchymal stem cells (MSC) on the proliferation inhibition of PBMC, and establish a standardized evaluation system, the 4th-generation umbilical cord MSC were used for cell morphology, (下转第 405 页)