

特约综述



潘国宇, 中国科学院上海药物研究所研究员, “百人计划”, 课题组长。肝脏是机体代谢和解毒最主要的器官之一, 也是机体多种蛋白质合成的“生物工厂”。潘国宇课题组主要开展药物的肝脏代谢和毒性机制研究、开发新型肝样细胞、建立离体药物筛选替代模型。近年来该课题组在干细胞治疗的细胞动力学研究中取得了一定进展。

细胞的命运: 间充质干细胞的药代动力学

韩立^{1,3} 惠利健^{2,3} 潘国宇^{1,3*}

(¹中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; ²中国科学院上海生物化学与细胞研究所, 上海 200031; ³中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 细胞药物已成为药物研发中最新的领域之一。由于细胞药物具有增殖和自主趋化的能力, 其体内药理学特征和传统的小分子和大分子药物差异很大。目前虽然细胞药物已经开始走向临床, 但是对于细胞类药物进入体内之后的命运变化普遍缺乏认识。如果能够借助经典药代动力学理论, 预测不同细胞产品的体内分布、代谢/排泄规律, 进而在细胞药物进入机体之后的动态分布和细胞疗效之间建立关系, 将可以有效提高细胞药物的临床疗效, 降低风险, 减少药物的相互作用。在该文中, 我们以间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)为例, 总结整理了现有的一些研究成果, 试图对细胞药物的药代动力学和其药效动力学、毒效动力学的关系进行归纳, 为今后进一步探索细胞药物在体内命运做出贡献。

关键词 间充质干细胞; 药代动力学; PK/PD/TD

The Fate of Cells: Pharmacokinetics of MSC

Han Li^{1,3}, Hui Lijian^{2,3}, Pan Guoyu^{1,3*}

(¹Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China;

²Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Recently, cellular drugs have become one of the hottest areas in drug development. Cellular drugs are quite different from the traditional small molecules and macromolecular drugs, because of their proliferation and chemotactic abilities. With the help of pharmacokinetic theories, it would be feasible to describe and predict the fate of cell drugs, characterize their distribution, metabolism, and excretion in the body. That will improve the clinical efficacy and safety of the cellular drugs, reduce the risk of drug-drug interactions. In this paper, we take

*通讯作者。Tel: 021-20231000-2503, E-mail: gypan@simm.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-20231000-2503, E-mail: gypan@simm.ac.cn

mesenchymal stem cell (MSC) as an example, trying to clarify the relationship between the pharmacokinetics and the efficacy/toxicity (PK/PD/TD) of cell drugs according to published literatures.

Keywords MSC; pharmacokinetics; PK/PD/TD

随着诺华制药的CAR-T产品KYMRIAH在2017年8月被美国FDA批准上市, 人类疾病治疗从小分子药物到生物大分子药物之后, 又迎来一个新的台阶——细胞类药物^[1]。细胞治疗的时代到来的如此迅速: 美国FDA通过对诺华制药KYMRIAH审批通过后, 仅仅三个月后又批准Kite公司的KTE-C19上市。这标志着细胞产品已经正式作为药物走进临床。

事实上, 这些年有大量临床研究结果显示, 细胞治疗在癌症^[2]、关节炎^[3-5]、中枢神经系统病变^[6-9]等领域均显示了明显的疗效。各种迹象显示, 基于免疫细胞、干细胞等的细胞药物已经成为未来药物研发中最具发展前景的领域之一。早在2012年, 美国FDA就对成体细胞治疗临床研究提出了指导意见, 并对细胞、组织及其衍生产品的生产、研发以及临床实验等作出了规定。中国国家食品药品监督管理总局(CFDA)也先后发文出台了《干细胞通用要求》以及《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》, 对于干细胞治疗进行风险管控, 对于细胞批次、质量控制、工艺流程等提出了要求, 并且对于细胞药物临床前实验的药效和安全性评价都给出了指导性建议。遗憾的是, 无论是FDA还是CFDA, 对于如何确认细胞药物体内暴露量及其疗效之间的关系都没有做出明确的规定, 对于如何进行细胞药物的药代动力学工作也只是提议具体产品具体分析。这一方面和细胞药物体内示踪方式有限有关, 另一方面也是由于目前对细胞药物与小分子药物的体内药代动力学的差异缺乏认识。

目前, 虽然有一些关于细胞体内分布的研究, 但是对于细胞药物的吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)、排泄(excretion)、毒性(toxicity)的系统性研究几乎没有。实际上, 通过细胞药代动力学研究, 有可能了解并准确描述异体/自体细胞进入机体之后的命运变化, 准确预测不同细胞产品的体内分布、代谢/排泄规律, 进而提高细胞产品的临床疗效, 降低风险, 减少药物之间的相互作用。

在现有的细胞药物中, 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)因其具有多能干细胞以及免疫调节

的特性, 在实验室和临床开展了最为广泛的研究, 极有可能成为下一个细胞药物。因此, 在本文中, 我们以研究最为广泛的MSC为例, 总结整理了现有的一些研究成果, 试图对细胞药物的药代动力学和其药效、毒性的关系进行归纳, 并和大小分子药物的体内特征进行比较, 为进一步探索细胞药物在体内的命运做出贡献。

1 MSC的研究背景

1960年, McCulloch等^[10]从骨髓中分离并在体外培养了一种具有分化潜能的细胞。1974年, Alexander等^[11-12]证明了这种骨髓来源的细胞能够分化成为软骨组织。1991年, Caplan^[13]将这种细胞命名为MSC。1995年, Lazarus等^[14]第一次用体外培养后的MSC注射到人体内, 证明了MSC用于人体上是安全的。1999年, Pittenger等^[15]确认了MSC是具有多向分化潜能的多能干细胞。2001年, 开展了第一例利用MSC修复骨折的临床应用^[16]。后续研究发现, MSC能够抑制多种免疫细胞(如B细胞、T细胞、DC细胞等)^[17-20], 对免疫系统起到调节作用。由于MSC的免疫调节功能, 使得MSC被用于治疗与免疫系统相关的疾病。2006年, Yañez等^[21]报道的脂肪来源的MSC具有免疫抑制特性, 可用于在鼠中控制移植宿主疾病(GVHD)。2007年, Fang等^[22]用脂肪来源的MSC治疗GVHD病患者, 取得一定疗效。2009年, Sun等^[23]的报道显示, 抑制骨髓间充质干细胞在小鼠和人类上可改善红斑狼疮。

和其他干细胞相比, MSC的免疫原性较低, 免疫调节作用明显。此外, 由于MSC在人和动物的骨髓、脐带血、外周血、脂肪及肝脏等器官组织中均有分布, 其获取和分离相对简单, 普通医院均可以进行。过去十几年间, 产生了大量的MSC临床研究, MSC对于肝硬化^[24-25]、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)^[26-27]等多种疾病均有较好的疗效。截止2017年, 世界范围内有登记的各类MSC临床试验超过500个。根据数据统计(<https://clinicaltrials.gov/>), 现正在开展和已经结束的MSC临床研究的病例约有270个。大多数临床研究处于I和II期(约220个), 还有

大约15个案例进入临床III期, 但是, 尚未有美国FDA获批的MSC药物, 也没有进入IV期临床的间充质细胞药物。这一方面由于MSC制备工艺不稳定, 药效作用机制不明确; 另一方面也和我们对于MSC的体内命运缺乏了解有关系。

无论是什么形式的药物, 其药效和毒性必然存在作用的物质基础, 这是药物的药代/药效/毒性(PK/PD/TD)研究的理论依据。作为一种药物, 研究其在体内的变化对于判断其疗效和可能产生的毒副作用都是十分关键的。但是, 相对于小分子和大分子药物相对成熟的体内药代动力学研究, 人们对于细胞药物体内命运缺乏认识。以诺华制药刚刚获批的CAR-T产品KYMRIA为例, 审评者在肯定其疗效的同时, 也很遗憾地指出, “如果能够进行系统研究, 找到合适剂量, 这不仅仅可以提高疗效, 也可能减少细胞因子风暴。”

因此, 我们有必要利用传统的药代动力学理论, 结合细胞药物的自身特点, 系统地研究细胞药物的药代动力学。遗憾的是, 至今为止, 国际上尚未建立细胞药物体内药效(efficacy)和细胞药物在动物或人体内药代动力学之间的关系。这是因为无论是检测方法还是动力学理论, 细胞药物的药代动力学都和以往的经典药代动力学研究差别很大。例如, 小分子药物的体内清除往往具有一级动力学特征, 其体内特性可以通过数学模型进行拟合和预测。细胞药物有增殖能力, 进入体内之后的浓度变化往往有非线性特征。并且, 细胞具备迁移和靶向能力, 在机体内部的运动既和体液循环和细胞表面特征有关, 又具有一定的生物靶向性质。此外, 细胞药物的生物活性和释放细胞因子的能力密切相关, 对于细胞药物药效的研究有时候可能转化为对于相关细胞因子的研究, 这一点和小分子药物的活性代谢产物既有相似之处, 又有很大差异(表1)。

2 MSC等细胞药物的体内监测

MSC等细胞药物进入体内首先需要能够被检测到, 然后才能进行后续研究工作。目前的检测手段主要可以分为侵入式(收集体液和组织测定细胞的mRNA、特定蛋白质等)和非侵入式(活体成像技术等)两大类。不同的检测手段有各自的优势, qPCR能够定量/半定量测定特定组织中的细胞数量^[28]; 小动物活体成像(*in vivo* imaging system, IVIS)、同位

素标记等则能定性地在整体水平上反应细胞药物体内分布^[29-30]。

非侵入式检测对于人或者动物损伤小, 可以进行动态追踪, 定性反应输入细胞的体内分布。目前有报道的包括荧光^[31]、转基因^[32-33]、同位素^[34]和磁性离子^[35]等手段, 体外标记MSC, 然后在体内检测来判断MSC细胞的存活以及清除命运。需要注意的是, 某些标记手段会对MSC活性会有影响, 例如, 同位素标记有可能损伤MSC活力和分化能力^[36-37]; 而新型的纳米碳量子点追踪MSC体内动态的同时, 可以促进骨髓MSC向成骨细胞分化, 人为地提高了MSC的清除速率^[38]。这对于需要准确定量的药代动力学而言, 都不是一个好消息。在MSC标记实验中, 最好用两种标记方法进行标记, 相互对比验证。在实际工作中, 往往是多种检测方式共同使用, 这样判断出的体内MSC存活率和清除率才更为可靠。

目前可以实现定量的MSC体内测定还是依靠侵入式检测, 首选的检测方式是qPCR。qPCR可以通过检测DNA含量, 实现对血液、组织样品中的MSC进行定量分析。临床前的检测可以使用人源性特殊基因片段(例如灵长类动物特有的*Alu*基因或是人微球蛋白基因)作为生物标志物, 用于检测人源性MSC在动物体内的分布和清除^[39-41], 理论上灵敏度可以达到fM级别^[42]。遗憾的是, 目前采用qPCR技术对于MSC的定量研究有限, 数据存疑。例如, 有文献报道, qPCR的测定灵敏度可以达到0.01 ng的gDNA, 相当于可以从10 000个鼠源性细胞中找出1个人源性MSC, 但是, 目前采用的分析方法并没有考虑在体条件下基质效应等对于qPCR测试的干扰, 也没有进行样品的回收率实验, 实验的准确性存疑^[40,43]。因此, 有必要利用药学研究中的生物分析技术原理, 进一步系统提高MSC在体定量研究的准确性和可靠性。

此外, 还有一些新的技术运用到MSC的定量检测中。比如, 体内流式细胞技术^[44], 这种技术可用于定量循环中荧光标记的细胞且无需提取血液样品, 是一种无创的检测方法。Xie等^[45]利用该技术比较了MSC在健康老鼠和患肿瘤的老鼠中MSC的分布和清除情况, 证明肿瘤会诱导MSC聚集。

3 细胞治疗的体内暴露和药效/毒性的关系

3.1 细胞药物的吸收、剂量和药效

传统小分子的给药途径分为血管外和血管内

表1 大分子、小分子、细胞药物的药代特征比较

Table 1 Comparison of pharmacokinetic characteristics of macromolecules, small molecules and cellular drugs

药代性质 Pharmacokinetic characteristics	小分子药物 Small molecule drugs	大分子药物(单抗、多肽) Macromolecular drug (monoclonal antibody, polypeptide)	细胞药物 Cellular drugs
Absorption	Drug absorption differs depending on the route of administration and is divided into intra-vascular and extra-vascular administration. Oral drug absorption is related to drug properties, gastrointestinal properties	Intravenous administration	Intravenous administration, orthotopical administration (eg intra-articular injection, in situ injection or transplantation)
Distribution	The drug distribution is affected by the physical and chemical properties of the drug itself. And the blood flow velocity of the body, the drug transporters, the combination of drug and plasma protein, and the physiological barrier in human body also affect the drug distribution	The distribution of antibody drugs is affected by the drug structure as well as the affinity with antigens. And the drugs mainly distributed in plasma and extracellular fluids. For amino acid sequences play a targeted role, drugs are usually accumulated in the target tissue	The cell products were accumulated in organs with sufficient blood flow such as lungs, and also distributed in other targeted tissues. According to reports, cell products would distribute in some target organs and pathological tissues, which are closely related to the function of "homing". While the experimental reports are quite different from each other, and there is no definitive conclusion
Metabolism & elimination	Many drugs are metabolized by various enzymes such as CYPs. The main metabolic organs include the liver, kidneys, lungs and intestines. Metabolites are excreted through the liver, kidneys, and other ways	Many drugs are metabolized by endoplasmic reticulum enzymes and proteases; and the metabolites are excreted mainly through the kidneys	The immune system, cell apoptosis and cell differentiation all play roles in the clearance of MSCs. The disposition of cell residues of allogeneic cells death have not been reported
Toxicity	Liver toxicity; nephrotoxicity; organ toxicity caused by accumulation; off-target toxicity; DDI caused toxicity; and nonspecific toxicity accounts for a large proportion of small molecule drug toxicity	Renal toxicity caused by renal excretion difficulties of macromolecular drugs; immunogenic reactions and target-specific toxicity are higher in macromolecular drug toxicity	The mechanism of toxicity is complex. Toxicity is mainly manifested in potential risks of immunosuppression and tumorigenicity. On the other hand, the impact of a large number of allogeneic cells entering into the body circulatory system needs to be evaluated

给药。吸收, 一般指血管外给药后, 药物从给药部位到体循环的环节。通常, 细胞给药大部分都是通过血管内途径给药, 从这个角度来看, 细胞药物不存在吸收的过程。但是, 不同给药方式依然会对疗效有一定影响。静脉注射操作简单, 是细胞治疗中最普遍的给药方式。此外, 根据不同疾病特征, 也存在非静脉给药方式。比如: 在结肠炎的治疗中, 研究者发现腹腔给药相较于静脉给药, MSC更加容易聚集到受损部位, 肠道黏膜的恢复水平更好^[46]; 在心肌梗死的治疗中, 研究者直接将MSC注射到受损的部位, 发现MSC能够促进肌血管再生, 改善心肌梗死^[47]; 在关节炎的治疗中, 关节腔给药是最能发挥药效的治疗方式, 其原因可能是因为关节腔内给药后MSC浓度能长期维持, 达肌肉水平的100倍以上^[43,48]。

在MSC等细胞制品的吸收研究中, 给药剂量和药效的关系是一个迫切需要关注的问题。例如, 有相当多报道证明, MSC在治疗心脏疾病^[49-51]、关节炎^[52]、GVHD^[22,53]等疾病中取得很好的疗效。但是对于MSC剂量、疗程和疗效的关系没有进行应有的探索往往实验者在研究中默认MSC给予量在 $10^5 \sim 10^7/\text{kg}$ 之间, 对于确切的细胞给予数量、细胞纯度和药效之间的关系并不清楚。Hashemi等^[51]在研究MSC治疗急性心肌梗死的实验中, 分别给予大鼠 2×10^7 、 2.4×10^8 、 4.4×10^8 (细胞/动物)三个剂量的MSC, 然后检测心脏功能恢复指标, 发现不同剂量组间并没有显著差异, 作者即推测MSC疗效与剂量没有依赖关系。事实上, 在另外一项MSC对于绵羊心肌梗死后修复的研究中, 研究者发现, MSC在

较低剂量($2.5 \times 10^7 \sim 7.5 \times 10^7$)下的药效要强于高剂量($2.5 \times 10^8 \sim 4.5 \times 10^8$)^[54]。这些结果表明, MSC剂量增加有可能和小分子一样, 疗效有平台期, 甚至产生剂量相关性的毒副作用。在一项MSC和肿瘤相关性研究中, 研究者发现, 少量的MSC可以有效抑制肿瘤细胞生长, 大量(10^6)MSC则使实验动物的肿瘤发生率和体积都大大提高^[55]。更高的MSC剂量还有可能直接造成实验动物的死亡^[39]。

因此, 在MSC等干细胞研究中, 应该效仿小分子和大分子药物研究, 注意量效关系的探索, 查明观察到的现象背后的深层次机制和细胞制品体内暴露量的关系。

3.2 分布

药物在体内的分布除了药物本身理化性质之外, 主要还受到血流量、药物转运体、人体生理屏障等因素的影响。小分子药物还受到血浆蛋白、组织非特异性结合以及转运体转运的作用。大分子药物一般不与血浆蛋白结合, 和组织、细胞的结合也大多具有靶向性。细胞药物的分布则相对更加复杂, 因为细胞药物是活的, 且具有一定靶向性, 在疾病状态下分布的改变更加明显, 而且病人的年龄、给药方式都会影响MSC的分布, 进而影响药效^[56-57]。

从目前的数据来看, MSC等细胞药物进入体内之后, 在最初的时间里, 主要分布在血液和淋巴循环丰富的组织器官。Zangi等^[58]以Balb/C小鼠为研究模型, 发现当通过静脉注射给予鼠源的MSC后2小时, MSC先聚集在肺部, 之后是肝肾。在裸鼠上的研究发现, 当给予人脂肪来源的MSC后, MSC主要分布在肺部, 但是肝肾的组织也能检测到相当数量的人源MSC^[59]。临床上, Gholamrezanezhad等^[60]用放射标记骨髓来源的MSC, 追踪其在体内的分布, 发现MSC首先在肺部聚集, 然后是肝脏和脾脏。到目前为止, 比较公认的是, MSC等在肺部分布最多, 其他组织分布差异很大。例如, 有文献报道, MSC等细胞进入体内, 在肌肉、脾脏分布要远远高于肝、肾和骨髓^[61]。

上述现象单纯是由于肺、肝、肾等器官的血流量充足引起, 还是由于别的原因引起尚不得而知。有一种解释是, 由于静脉给药后, 细胞药物在经过血流量充足的肺部时, 由于MSC等细胞直径大于肺系的毛细血管直径, 导致MSC在肺部被滞留下来。一个间接的证明是, 以大鼠为实验对象的研究发现, 当给予血管扩张药物硝普化钠之后, 相较于没有给硝

普化钠的组, 聚集在肺部的MSC数量显著下降^[62]。这个研究在一定程度上支持了上述这种说法。此外, 必须考虑干细胞的重新分布现象——肺部的MSC可能在48小时内重新分布到其他组织^[63]。

考虑到MSC具备自主定向迁移的特性, 似乎不应该把它们分布完全归于一个被动过程, 必须考虑“归巢”等主动因素的影响。

3.3 “归巢”——细胞药物特殊的组织分布现象

“归巢(homing)”最早是指某一特定的淋巴细胞群或亚群定向归巢到相应的组织或器官, 是由Gallation在1983年提出^[64]。后来“归巢”这一概念逐渐引申至干细胞。2009年, Krap等^[65]提出, 将“间充质干细胞归巢”定义为MSC在特定组织中血管系统里被捕获, 随后跨越血管内皮细胞迁移至特定组织的过程。当机体缺血、缺氧、损伤时, MSC具有向损伤部位优势分布的特质。Ortiz等^[66]用博来霉素诱导小鼠肺损伤, 在给予小鼠MSC后, 发现MSC可以“归巢”到受伤的肺部, 并分化成上皮样表型的细胞, 并减少肺组织炎症。在mdx小鼠上探索MSC在治疗肌肉损伤功能时, 研究者发现, 移植的MSC会迁移到受损部位, 并分化成骨骼肌细胞^[67]。“归巢”现象发生的原因可能和MSC细胞表面的化学因子受体有关, CCR1、CCR4、CCR7、CCR10、CCR9、CXCR5、CXCR4和CXCR6等都可能在不同程度上参与了MSC的迁移过程^[63,68-69]。

许多研究者认为, MSC的归巢能力可能是MSC起到治疗作用的关键。但是需要指出的是, 外源性提供的MSC细胞“归巢”到损伤部位的数量往往有限且不会持久^[70]。例如, 即使通过冠脉注射, 骨髓来源的MSC在注射75分钟后只有不到2.6%留在梗死区域^[71]。在肿瘤动物模型中, 据估计向肿瘤部位发生“归巢”的MSC不足注射剂量的0.01%^[55]。目前比较主流的观点是, MSC的免疫调节功能可能在疾病治疗中发挥更加重要的作用。有研究发现, 在治疗GVHD等自身免疫疾病中, MSC通过免疫抑制作用起到治疗作用^[72-73]。MSC分泌物如外泌体^[74-75]等也能起到治疗作用。Li等^[75]证明了人脐带来源的MSC的外泌体可以通过抑制EMT(上皮间质转化)而改善CCl₄诱导的肝纤维化保护肝细胞; Ruenn等^[7]证明, MSC通过旁分泌出外泌体能够改善心肌缺血再灌注损伤。所以在MSC的治疗作用中, 可能有一部分是通过MSC分泌的外泌体来实现的。

综合现有研究结果我们推测, MSC及其分泌的肿瘤坏死因子诱导基因-6(TSG-6)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、白介素-6(IL-6)、前列腺素E(PGE)等^[40,76-77]起到的免疫调节功能可能发挥最主要的疗效, 而MSC迁移到疾病病灶部位并分化成特定细胞这一能力, 对某些疾病(如关节炎)的治疗也起到了帮助^[78-80]。需要指出的是, MSC分泌的细胞因子在其药效中意义重大, 其药代动力学特征和MSC本身差别明显, 在某种程度上起到了小分子药物代谢研究中的“活性代谢产物”作用^[81]。因此, 探索不同疾病中MSC归巢的意义, 并针对MSC产生的“药效物质”进行体内分布和药效关系研究, 可以使得MSC治疗有更好的针对性。

3.4 清除与排泄

细胞药物的代谢和清除有自己的特殊性。一般而言, 小分子药物往往在通过肝脏I、II相代谢酶代谢修饰后, 通过肾脏或是胆汁排泄; 大分子在体内主要的清除途径是通过全身的蛋白酶体系分解代谢或是靶标介导的清除(target mediated clearance, TMC)。外源性细胞药物的清除主要和免疫系统有关。例如, 有文献报道显示, 激活的NK细胞可以杀死MSC, 这可能是MSC体内清除的主要途径之一^[82]。对于细胞药物的清除部位, 目前没有统一说法。有文献报道, 静脉注射的MSC会在20小时之内在肺部富集并且不会再次分布到其他组织, 然后在48小时内被清除^[43]。另外, 有研究发现, 肺部受到放射损伤的大鼠和正常的大鼠对于外源性MSC清除时间有明显不同。受到放射损伤的大鼠, 在2小时内MSC聚集在肺部, 72小时后达到峰值, 在第7天依然有很高的响应值, 直到14天后完全消失。在正常大鼠, 普遍的响应值比较低, 并且在第7天的时候已经基本被机体清除完毕^[83]。肺部损伤动物对于MSC消除速率下降这一事实暗示肺部可能是MSC清除的主要部位之一。

MSC在体内存活周期到底是多长, 不同文献差异巨大。有文献报道, 静脉注射后的MSC在体内的存活时间不超过1天^[82]。研究人员从 β -galactosidase转基因小鼠中分离出MSC, 再注射到心肌梗死区, 发现大约在28天后, MSC才基本消失^[84]。另有文献报道, MSC在体内的生存周期很长, 在免疫缺陷的小鼠上可以长达17个月^[85]。Vilalta等^[59]从人脂肪分离MSC后, 转染EGFP后注射进裸鼠体内, 他们发现, 在1周内大约75%的人源的MSC被清除, 而肝脏内的

MSC在32周时依然可以被检测到。

以往实验中MSC生存时间的巨大差异可能与选择的动物品系有关。Zangi等^[58]比较正常小鼠、裸鼠、NOD/SCID、Balb/c小鼠体内MSC的清除时间, 发现免疫缺陷的裸鼠、NOD/SCID在120天依然能够观察到MSC, 而具备免疫系统的Balb/c小鼠在20天左右就已经检测不到MSC信号。目前认为, MSC的清除主要是通过免疫系统来识别并清除的, 因此使用免疫缺陷动物(裸鼠、NOID/SCID等)研究MSC等细胞药物的药代动力学并不合理。此外, 由于MSC的治疗功能有一部分是通过免疫调节实现的^[86], 用免疫缺陷型动物开展药效研究也不是十分理想。鉴于MSC免疫原性较低, 很多研究直接使用正常动物进行人源性MSC的药效学和药代动力学研究。例如, Sadeghi等^[87]证明, 人源MSC在正常大鼠模型上对于治疗产后损伤, 慢性免疫性血小板减少症有治疗作用。但是对于小鼠免疫细胞能够在多大程度上识别人类MSC并没有详细报道。

需要指出的是, MSC的分化潜能是有限的。体外研究的数据表明, MSC平均最长的培养时间是118天, 平均传代次数是9代, 之后MSC普遍会丢失性状^[88]。有研究者通过基因芯片的手段分析MSC体外培养第3、5、7代之间的基因表达差异, 发现有78个基因发生变化, 主要是涉及细胞增殖和生长的基因^[89]。因此, 有理由怀疑, 虽然在实验动物中, 研究者在30多周甚至更长时间能够检测到细胞的标记信号, 但是那可能是已经分化后的MSC, 而不是一开始具有分化潜能和治疗效果的MSC。并且, 在体外实验中发现, 当MSC形态改变后, MSC本身的干细胞分化能力显著下降^[88]。Wassef等^[90]用分化和未分化的MSC在治疗糖尿病的大鼠中发现, 分化后的MSC基本没有疗效, 因此推断, MSC的确切清除周期不能仅仅通过标记信号来判断。但是, 如何检测具有功能的MSC, 目前尚无较好的方法。

3.5 MSC的毒副作用

目前MSC的临床试验中没有显示这些细胞安全性的不利事件。尽管如此, 由于MSC药效机制复杂、靶点众多, 因此, 需要更多的证据来从多方面评估其毒副作用。例如, 与MSC治疗相关的潜在的长期风险可能无法在短期内观察到, 这些风险包括MSC的免疫抑制和促进肿瘤生长作用。尤其是对于癌症患者使用MSC治疗需要谨慎, 因为已经有明确证据表明,

MSC能够分泌趋化因子(例如CCL5), 在MSC进入肿瘤基质后, 促进癌症细胞迁移, 加速患者病情恶化程度^[91]。此外, 癌细胞分泌的外泌体会诱导MSC转化成癌细胞; 而体内的MSC也会被肿瘤组织招募, 分泌生长因子, 帮助肿瘤组织血管生成^[92-93]。

由于目前细胞治疗大多还是通过静脉注射给药, 而MSC倾向于在肺部聚集。因此给与MSC后细胞有可能引起肺部栓塞, 进而侵入肺实质。考虑到MSC的免疫抑制作用, 有文献认为, 这从另外一方面增加了肿瘤发生的风险^[94]。但是该研究是在免疫缺陷的小鼠上进行的, 在具有正常免疫功能的动物是否会出现类似现象还需要进一步确认。当然, 如果患者自身免疫功能低下的话, MSC成瘤的可能性无法完全排除。此外, MSC的免疫抑制疗效有可能会产生风险。在一例MSC的临床研究中, 有患者出现了真菌感染和肾衰现象, 医务人员推测, 这有可能是MSC的免疫抑制的副作用^[95]。

药物的毒性和疗效往往是相辅相成的, 很难发现绝对无毒又疗效卓越的药物。MSC作为细胞治疗药物, 具有副作用也不意外。事实上, 有报道不同剂量的MSC对于实验动物体内肿瘤生长的作用是不同的^[96]。MSC低剂量时, IFN- γ 相关抗原可能可以刺激T细胞增殖, 强化机体的免疫调控; 而大剂量的MSC则体现了免疫抑制作用^[55]。从这个角度来看, 如果能够建立起MSC的量效关系, 发现MSC合理的临床剂量, 可能能极大程度上规避MSC带来的副作用, 提高疗效, 这正是细胞药代动力学研究的意义所在。

4 展望

细胞治疗是新药研发的新趋势。开发具备真正临床疗效的MSC是科学家努力的目标。但是MSC治疗效果不稳定、缺乏明确机制研究等因素均阻碍了其成药性。至今为止, 虽然有大量临床研究在进行中, 目前只有Osiris公司的Prochymal作为孤儿药, 用于治疗GVHD。MSC仍然没有作为药物被美国FDA获批。但是我们看到, 目前已经有一些MSC治疗药物, 比如Mesoblast公司的MPC已经被批准在澳大利亚上市。2018年2月, Mesoblast公司宣布, 研发的治疗类固醇难治性急性移植物抗宿主病(aGVHD)的间充质干细胞候选产品MSC-100-IV(remestemcel-L)在第28天的总缓解率(ORR)达到69%, 与45%的历史控

制率相比有显著性差异。此药物第3期临床试验成功, 将拟申报美国FDA批准。这是一个令人振奋的消息, 但是MSC作为一种药物研发依然有比较长的路要走。通过研究MSC在体内的动力学过程, 我们可以更好地检测MSC在体内的动态变化, 确定其作用机制, 同时, 能够预测MSC治疗中合适的剂量, 这对于探索MSC药物合适的治疗窗并降低MSC治疗中的不确定性、增加疗效和减少毒性等会有很大帮助。

参考文献 (References)

- 1 Fox IJ, Daley GQ, Goldman SA, Huard J, Kamp TJ, Trucco M. Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. *Science* 2014; 345(6199): 1247391.
- 2 Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra25.
- 3 Wang L, Wang L, Cong X, Liu G, Zhou J, Bai B, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev* 2013; 22(24): 3192-202.
- 4 Emadedin M, Ghorbani Liastani M, Fazeli R, Mohseni F, Moghadasali R, Mardpour S, *et al.* Long-term follow-up of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in patients with knee, ankle, or hip osteoarthritis. *Arch Iran Med* 2015; 18(6): 336-44.
- 5 Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ, Tak DH. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial. *Arthroscopy* 2016; 32(1): 97-109.
- 6 Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 2010; 28(6): 1099-106.
- 7 Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 214-22.
- 8 Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010; 223(1): 229-37.
- 9 Marsh SE, Blurton-Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochem Int* 2017; 106(Suppl C): 94-100.
- 10 Becker AJ, McCulloch CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-4.
- 11 Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2(2): 83-92.

- 12 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5): 267-74.
- 13 Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641-50.
- 14 Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transp* 1995; 16(4): 557-64.
- 15 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- 16 Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, *et al.* Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344(5): 385-6.
- 17 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* 2002; 30(1): 42-8.
- 18 Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105(7): 2821-7.
- 19 Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; 101(8): 2999-3001.
- 20 Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13(3): 263-71.
- 21 Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2582-91.
- 22 Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2007; 39(10): 3358-62.
- 23 Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009; 27(6): 1421-32.
- 24 Elberry DA, Amin SN, Esmail RS, Rashed LA, Gamal MM. Effect of undifferentiated versus hepatogenic partially differentiated mesenchymal stem cells on hepatic and cognitive functions in liver cirrhosis. *EXCLI J* 2016; 15: 652-70.
- 25 Liang J, Zhang HY, Zhao C, Wang DD, Ma XL, Zhao SN, *et al.* Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases. *Int J Rheum Dis* 2017; 20(9): 1219-26.
- 26 Sykova E, Rychmach P, Drahoradova I, Konradova S, Ruzickova K, Vorisek I, *et al.* Transplantation of mesenchymal stromal cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of Phase I/IIa clinical trial. *Cell Transplant* 2017; 26(4): 647-58.
- 27 Kim HY, Kim H, Oh KW, Oh SI, Koh SH, Baik W, *et al.* Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an investigator-initiated trial and *in vivo* study. *Stem Cells* 2014; 32(10): 2724-31.
- 28 Gong M, Yu B, Wang JC, Wang YG, Liu M, Paul C, *et al.* Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* 2017; 8(28): 45200-12.
- 29 Wu C, Li JG, Pang PF, Liu JJ, Zhu KS, Li D, *et al.* Polymeric vector-mediated gene transfection of MSCs for dual bioluminescent and MRI tracking *in vivo*. *Biomaterials* 2014; 35(28): 8249-60.
- 30 Schachinger V, Aicher A, Dobert N, Rover R, Diener J, Fichtlscherer S, *et al.* Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium. *Circulation* 2008; 118(14): 1425-32.
- 31 Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy* 2018; 20(2): 232-44.
- 32 Wu Z, Chen G, Zhang J, Hua Y, Li J, Liu B, *et al.* Treatment of myocardial infarction with gene-modified mesenchymal stem cells in a small molecular hydrogel. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15826.
- 33 Bang OY, Jin KS, Hwang MN, Kang HY, Kim BJ, Lee SJ, *et al.* The effect of CXCR4 overexpression on mesenchymal stem cell transplantation in ischemic stroke. *Cell Med* 2012; 4(2): 65-76.
- 34 Ghazavi H, Hoseini SJ, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Mashkani B, Mehri S, Ghorbani A, *et al.* Fibroblast growth factor type 1 (FGF1)-overexpressed adipose-derived mesenchymal stem cells [AD-MSC(FGF1)] induce neuroprotection and functional recovery in a rat stroke model. *Stem Cell Rev* 2017; 13(5): 670-85.
- 35 Liu L, Ho C. Mesenchymal stem cell preparation and transfection-free ferumoxytol labeling for MRI cell tracking. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2017; 43(1): 2B.7.1-2B.7.14.
- 36 Sharkey J, Scarfe L, Santeramo I, Garcia-Finana M, Park BK, Poptani H, *et al.* Imaging technologies for monitoring the safety, efficacy and mechanisms of action of cell-based regenerative medicine therapies in models of kidney disease. *Eur J Pharmacol* 2016; 790: 74-82.
- 37 Gu E, Chen WY, Gu J, Burridge P, Wu JC. Molecular imaging of stem cells: tracking survival, biodistribution, tumorigenicity, and immunogenicity. *Theranostics* 2012; 2(4): 335-45.
- 38 Shao D, Lu MM, Xu D, Zheng X, Pan Y, Song YB, *et al.* Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomater Sci* 2017; 5(9): 1820-7.
- 39 Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, Bourin P, van Lent PL, Ferreira R, *et al.* Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum* 2013; 65(7): 1786-94.
- 40 Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, *et al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; 5(1): 54-63.
- 41 Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Kawamura T, *et al.* Xenobiotic kidney organogenesis from

- human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4): 1026-34.
- 42 Yeung BZ, Lu Z, Wientjes GM, Au JL. High sensitivity RT-qPCR assay of nonlabeled siRNA in small blood volume for pharmacokinetic studies: application to survivin siRNA. *AAPS J* 2015; 17(6): 1475-82.
- 43 Shim G, Lee S, Han J, Kim G, Jin H, Miao W, *et al.* Pharmacokinetics and *in vivo* fate of intra-articularly transplanted human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2015; 24(9): 1124-32.
- 44 Boxall S, Jones E. The use of multiparameter flow cytometry and cell sorting to characterize native human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC). *Methods Mol Biol* 2015; 1235: 121-30.
- 45 Xie C, Yang Z, Suo Y, Chen Q, Wei D, Weng X, *et al.* Systemically infused mesenchymal stem cells show different homing profiles in healthy and tumor mouse models. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(4): 1120-31.
- 46 Wang M, Liang C, Hu H, Zhou L, Xu B, Wang X, *et al.* Intraperitoneal injection (IP), intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci Rep* 2016; 6: 30696.
- 47 Zhang D, Fan GC, Zhou X, Zhao T, Pasha Z, Xu M, *et al.* Overexpression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(2): 281-92.
- 48 Cui D, Li H, Xu X, Ye L, Zhou X, Zheng L, *et al.* Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration of TMJ osteoarthritis. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 5979741.
- 49 Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(24): 2277-86.
- 50 Qi CM, Ma GS, Liu NF, Shen CX, Chen Z, Liu XJ, *et al.* Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells improves cardiac function in a swine myocardial infarction model. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121(6): 544-50.
- 51 Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdzić D, *et al.* A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008; 29(2): 251-9.
- 52 Swart JF, de Roock S, Hofhuis FM, Rozemuller H, van den Broek T, Moerer P, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in proteoglycan induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(4): 769-77.
- 53 Le Blanc K, Frassonni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371(9624): 1579-86.
- 54 Hamamoto H, Gorman JH, 3rd, Ryan LP, Hinmon R, Martens TP, Schuster MD, *et al.* Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg* 2009; 87(3): 794-801.
- 55 Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noel D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2006; 82(8): 1060-6.
- 56 Kaplan A, Sackett K, Sumstad D, Kadidlo D, McKenna DH. Impact of starting material (fresh versus cryopreserved marrow) on mesenchymal stem cell culture. *Transfusion (Paris)* 2017; 57(9): 2216-9.
- 57 De Witte SFH, Lambert EE, Merino A, Strini T, Douben HJCW, O'Flynn L, *et al.* Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy* 2017; 19(7): 798-807.
- 58 Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, Bachar-Lustig E, Beilhack A, Negrin R, *et al.* Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2009; 27(11): 2865-74.
- 59 Vilalta M, Degano IR, Bago J, Gould D, Santos M, Garcia-Arranz M, *et al.* Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev* 2008; 17(5): 993-1003.
- 60 Gholamrezaezhad A, Mirpour S, Bagheri M, Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Abdolazadeh L, *et al.* *In vivo* tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol* 2011; 38(7): 961-7.
- 61 Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony C, Sany J, *et al.* Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5): 1595-603.
- 62 Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(1): 12-20.
- 63 Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 130763.
- 64 Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983; 304(5921): 30.
- 65 Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 2009; 4(3): 206-16.
- 66 Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, *et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8407-11.
- 67 Liu Y, Yan X, Sun Z, Chen B, Han Q, Li J, *et al.* Flk-1⁺ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev* 2007; 16(5): 695-706.
- 68 Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; 24(4): 1030-41.
- 69 Von Lutichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, *et al.* Human adult CD34⁺ progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev* 2005; 14(3): 329-36.

- 70 Montanari S, Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Viswanathan S, Connelly KA, *et al.* Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34(11): 1481-8.
- 71 Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, *et al.* Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111(17): 2198-202.
- 72 Lim JY, Ryu DB, Lee SE, Park G, Min CK. Mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate cutaneous sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease (Scl-GVHD) through inhibition of immune cell infiltration in a mouse model. *J Invest Dermatol* 2017; 137(9): 1895-904.
- 73 Sangiorgi B, Panepucci RA. Modulation of immunoregulatory properties of mesenchymal stromal cells by Toll-like receptors: potential applications on GVHD. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 9434250.
- 74 Eldh M, Ekstrom K, Valadi H, Sjostrand M, Olsson B, Jernas M, *et al.* Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One* 2010; 5(12): e15353.
- 75 Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev* 2013; 22(6): 845-54.
- 76 Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, *et al.* Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol* 2008; 181(6): 4389-96.
- 77 Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, van de Water JA, Mohapatra G, *et al.* Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(12): 4822-7.
- 78 Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(10): 584-94.
- 79 Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Peyrafitte JA, Ferreira R, Facchini A, *et al.* Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res* 2013; 11(2): 834-44.
- 80 Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, *et al.* Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014; 32(5): 1254-66.
- 81 Elman JS, Murray RM, Wang F, Shen K, Gao S, Conway KE, *et al.* Pharmacokinetics of natural and engineered secreted factors delivered by mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 2014; 9(2): e89882.
- 82 Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 87-117.
- 83 Jiang X, Jiang X, Qu C, Chang P, Zhang C, Qu Y, *et al.* Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats. *Cytherapy* 2015; 17(5): 560-70.
- 84 Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, *et al.* Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130(5): 1310.
- 85 Lopez-Iglesias P, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Regadera J, Nistal M, Miguel MP. Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World J Stem Cells* 2011; 3(6): 53-62.
- 86 Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2062.
- 87 Sadeghi Z, Isariyawongse J, Kavran M, Izgi K, Marini G, Molter J, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in a rat model of birth-trauma injury: functional improvements and biodistribution. *Int Urogynecol J* 2016; 27(2): 291-300.
- 88 Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 14.
- 89 Bellayr IH, Catalano JG, Lababidi S, Yang AX, Lo Surdo JL, Bauer SR, *et al.* Gene markers of cellular aging in human multipotent stromal cells in culture. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(2): 59.
- 90 Wassef MA, Fouad H, Sabry D, Afifi N, Abbas AM, Mostafa W, *et al.* Therapeutic efficacy of differentiated versus undifferentiated mesenchymal stem cells in experimental type I diabetes in rat. *Biochem Biophys Rep* 2016; 5: 468-75.
- 91 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162): 557-63.
- 92 Yu FX, Hu WJ, He B, Zheng YH, Zhang QY, Chen L. Bone marrow mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell proliferation and invasion. *World J Surg Oncol* 2015; 13: 52.
- 93 Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837-44.
- 94 Aguilar S, Nye E, Chan J, Loebinger M, Spencer-Dene B, Fisk N, *et al.* Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1586-94.
- 95 Si YJ, Yang K, Qin MQ, Zhang CC, Du ZL, Zhang XM, *et al.* Efficacy and safety of human umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy in children with severe aplastic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective case series of 37 patients. *Pediatr Hematol Oncol* 2014; 31(1): 39-49.
- 96 Yang X, Hou J, Han ZP, Wang Y, Hao C, Wei LX, *et al.* One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 2013; 3(1): 5.