



时玉舫, 自受聘于中国科学院上海营养与健康研究所和苏州大学转化医学研究院开展研究以来, 带领团队主要致力于炎症与间充质干/基质细胞(MSCs)相互作用的基础和转化研究。团队通过一系列的研究, 系统地揭示了MSCs免疫调节作用的分子机制, 建立了MSCs根据炎症状态调节免疫反应的可塑性(plasticity)理论, 并率先阐述了MSCs与炎症之间的相互作用在塑造组织微环境中的作用, 提出了干细胞赋能(empowerment)的概念。

<http://itm.suda.edu.cn/html/direction/PI1/060112.html>

间充质干细胞在炎症性疾病治疗中的 基础研究和临床应用

王瑜¹ 徐慕晗¹ 郑凡君¹ 王莹¹ 时玉舫^{1,2*}

¹中国科学院上海营养与健康研究所, 中国科学院上海生命科学研究院, 中国科学院大学, 上海 200031;

²苏州大学附属第一医院和放射医学与辐射防护国家重点实验室, 苏州大学转化医学研究院, 苏州大学, 苏州 215123)

摘要 间充质干细胞/基质细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs), 由于其独特的免疫调节能力而备受关注。在治疗克罗恩病、移植物抗宿主病、系统性红斑狼疮以及器官纤维化等炎症性疾病的临床研究和应用中, MSCs均被报道可以抑制炎症, 缓解疾病进展, 展现出了良好的药用前景。MSCs调控炎症微环境、改善疾病的方式有很多, 总体而言, 在强烈炎症因子的刺激下, MSCs可以重塑组织微环境, 使之向有利于再生和免疫正常化的方向转变。机制上, 在炎症因子的刺激下, MSCs通过产生免疫抑制分子、生长因子、趋化因子、补体以及代谢产物等, 调控多种免疫细胞的迁移、增殖和活化等生物过程以达到调控炎症微环境的目的。更新的报道甚至提出凋亡的MSCs也能发挥免疫抑制的功能。此外, MSCs的免疫调节能力受炎症因子调控, 不是与生俱来又一成不变的, 因此, 依据微环境中炎症因子的种类、水平, MSCs的免疫调节功能也会发生变化。该文主要总结了近年来人们对MSCs免疫调节机制、MSCs与炎症微环境相互作用的理解以及应用MSCs治疗炎症性疾病的临床现状。

关键词 间充质干细胞; 炎症; 免疫调节; 临床试验

Immunoregulatory Mechanisms and Applications of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Inflammatory Diseases

Wang Yu¹, Xu Muhan¹, Zheng Fanjun¹, Wang Ying¹, Shi Yufang^{1,2*}

¹Shanghai Institute of Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, University of Chinese Academy of Sciences,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²The First Affiliated Hospital of Soochow University and

State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Institutes for Translational Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China)

中国科学院科技创新项目(批准号: XDA16020403)、国家重点研发计划项目(批准号: 2018YFA0107500)、国家科技部基金(批准号: 2015CB964400)和国家自然科学基金(批准号: 81530043、81330046、81861138015、31771641、81571612)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54923350, E-mail: yufangshi@sibs.ac.cn

This work was supported by the Scientific Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA16020403), the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFA0107500), the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2015CB964400) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81530043, 81330046, 81861138015, 31771641, 81571612)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-54923350, E-mail: yufangshi@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2019-05-10 14:09:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1301.020.html>

Abstract Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have attracted much attention due to their unique properties in immunoregulation. It has been reported that MSCs possess encouraging therapeutic potentials in treating various inflammatory diseases including inflammatory bowel disease, graft-versus-host disease, systemic lupus erythematosus and organ fibrosis. MSCs employ multiple mechanisms to regulate inflammatory microenvironment. In general, MSCs are thought to enable the remodeling damaged tissue microenvironment to a more regenerative one by suppressing vigorous inflammation and secreting growth factors. Mechanically, in the presence of inflammatory mediators, MSCs regulate various immunological processes including immune cell migration, proliferation and function through the production of immunosuppressive factors, growth factors, chemokines and metabolites. Recent reports even propose that apoptotic MSCs can be immunosuppressive. As the immunomodulatory capabilities of MSCs are not constitutive but rather are determined by inflammatory cytokines, MSCs function can vary depending on the levels and types of inflammation. Here, we summarize the current understanding of MSC-mediated immunoregulation and their interactions with surrounding microenvironments. We also discuss the advances of MSC-based therapies and related issues in treating inflammatory diseases clinically.

Keywords mesenchymal stem/stromal cells; inflammation; immunoregulation; clinical trials

能够自我更新并在一定条件下分化成其他细胞的未分化细胞通常被称为干细胞,是形成各组织、器官的原始细胞。根据其分化潜能,可以分为全能、多能和寡能干细胞。已有研究表明,干细胞不仅存在于胚胎或者胎儿中,也存在于成年个体的多种器官中,它们在维持组织稳态和组织损伤修复中扮演了重要角色^[1]。

相比于其他干细胞,间充质干细胞/基质细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)自上世纪60年代末被首次发现以来,得到了越来越多的基础和临床医学科学家的关注。MSCs由胚胎早期中胚层细胞发育而来,广泛地存在于脐带、骨髓、脂肪等多种组织中。MSCs易于分离和实现大量扩增,并具有很强的自我更新能力和向脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞分化的能力。由于尚缺乏有效的示踪标记来监测体内MSCs的动态变化,因而,目前对MSCs生物学特性的理解主要基于体外培养的以及输注回动物和人体内的细胞。

鉴于其多向分化的能力, MSCs已被广泛地应用于组织损伤修复和退行性疾病的治疗,并被认为能以“细胞替代(cell replacement)”的方式实现其治疗效果。的确,利用荧光、分子标记技术,有研究发现,输注的MSCs能够在一定程度上迁移并植入到受损组织^[2]。然而研究表明,这些输注的MSCs只能短时间存活,并没有有效地分化并替代受损的组织细胞^[3]。同时,在治疗如肝硬化、心肌梗死和肾脏衰竭等疾病的临床前实验中,尽管没有发现MSCs长时间地

存在,疾病却能得以缓解;甚至, MSCs的培养上清也能发挥其治疗作用^[4]。这提示, MSCs不仅仅依赖于分化成受损细胞实现细胞替代来发挥其疾病治疗作用。深入的研究表明,损伤部位的MSCs能积极地与微环境组分相互交流,尤其在炎症微环境的调控下, MSCs能够分泌大量的趋化因子、白细胞介素和生长因子等,调节损伤部位的炎症微环境,促进干细胞的增殖和分化,促进内皮细胞、成纤维细胞的激活、增殖以及细胞外基质的重塑,从而借以“细胞赋能(cell empowerment)”的方式,调动内源性的免疫细胞、组织细胞和干细胞等,重建组织微环境的稳态^[5]。

基于炎症在组织损伤和修复中的关键作用,以及MSCs对免疫细胞分化、增殖、迁移和功能的强大调节作用, MSCs已经成功地被应用到了包括移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GvHD)、克罗恩肠炎等多种炎症性疾病的治疗当中,并取得了令人鼓舞的成果^[6-7]。有趣的是, MSCs的免疫调节能力不是生而就有又一成不变的,而是由炎症的类型和强度赋予和决定的。深入理解MSCs介导的免疫调节规律,将有助于更好地设计基于MSCs的治疗新策略。在此,我们探讨了目前对MSCs免疫调节作用的理解及其相关机制,特别强调了组织微环境对MSCs特性的影响。同时,我们还总结了MSCs的临床应用现状,提出了优化MSCs治疗的新思路。

1 炎症与MSCs的相互作用

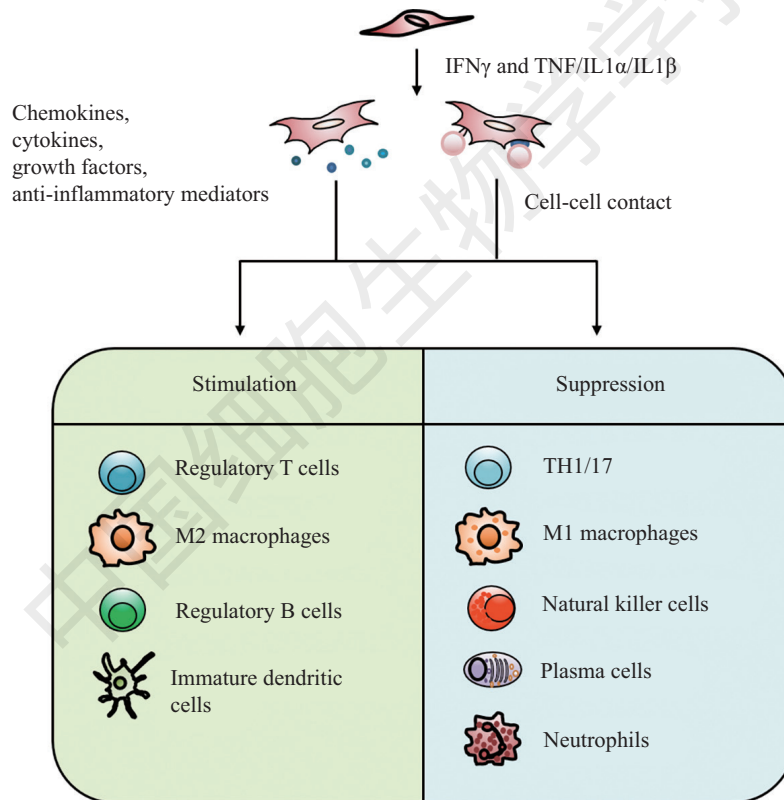
大量研究表明, MSCs可以通过多种途径调控炎

症、促进组织再生,从而缓解、甚至治疗多种炎症性疾病如GvHD^[8]、系统性红斑狼疮^[9]、多发性硬化^[10]、器官纤维化^[11]、炎症性肠病^[12]和关节炎^[13]。然而, MSCs的作用并不是一成不变的,而是严格受到炎症因子种类和水平的调节的。由于炎症性疾病中,炎症状态常常发生变化,因此炎症微环境中免疫细胞和免疫分子的功能、组成等因素的动态变化,均能影响MSCs免疫调节的结果。

1.1 MSCs对免疫细胞的调节

MSCs能够通过产生多种因子影响免疫细胞的招募、迁移、功能等,从而影响炎症的进程(图1)。大量研究证明,多种先天免疫细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞以及具有抑制功能的髓系细

胞、树突细胞和自然杀伤细胞等,均可以被MSCs调节^[14]。例如, MSCs可以通过其分泌的肿瘤坏死因子诱导基因6蛋白(TNF-stimulated gene 6 protein, TSG6),抑制巨噬细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞向炎症部位浸润。这种机制对应用MSCs以缓解心肌梗死、急性肺损伤、角膜损伤和腹膜炎至关重要^[15-18]。然而, MSCs还可以通过分泌趋化因子,促进单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞向肿瘤浸润,进而促进肿瘤生长、转移和化疗抵抗^[19]。这些看似矛盾的现象可能与炎症反应的类型和阶段有关。例如,特定因子如干扰素 γ (interferon γ , IFN γ)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)能够诱导MSCs产生趋化因子,进而招募单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞;



在炎症因子如IFN γ 和TNF/IL1 α /IL1 β 的刺激下, MSCs能够通过分泌趋化因子(如CCL5、CXCL10)、生长因子(如TGF β 、HGF)、细胞因子(如IL6)以及抗炎小分子(如NO、PGE2)等,抑制炎症反应及炎症相关细胞如TH1和TH17、浆细胞、促炎型M1巨噬细胞、自然杀伤细胞及中性粒细胞的迁移、增殖;或者促进具有免疫抑制功能的细胞如调节性T细胞和B细胞、抗炎型M2巨噬细胞以及未成熟树突状细胞的产生和功能。同时, MSCs还借助如PD-L1等分子,直接通过细胞间的接触来抑制T细胞的激活和功能发挥。输注的MSCs可能引起机体的免疫反应进而凋亡,凋亡的MSCs也具有诱导免疫抑制的能力。

Activated by IFN γ and TNF/IL1 α /IL1 β , MSCs can suppress the migration and proliferation of pro-inflammatory cells including Th1/Th17 cells, plasma cells, pro-inflammatory M1 macrophages, natural killer cells and neutrophils, or enhance the function and infiltration of anti-inflammatory B cells, M2 macrophages and immature dendritic cells through a concerted production of chemokines(CCL5, CXCL10), growth factors (TGF β , HGF), cytokines (IL6) and anti-inflammatory mediators (NO, PGE2). Beside these paracrine or endocrine factors, MSCs also directly inhibit T cell function through membrane bounded molecules including PD-L1. In addition, immunosuppression could also be induced by apoptotic MSCs.

图1 MSCs免疫抑制作用的特征和机制

Fig.1 Immunosuppressive mechanisms of MSCs

同时,在非啮齿类哺乳动物中,相同因子诱导的吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO),却通过调控TSG6抑制了髓系细胞的迁移^[20]。这些发现揭示了炎症微环境中MSCs与先天免疫细胞相互作用的复杂性,也使准确预测MSCs治疗结果面临巨大挑战。

MSCs能够通过调节先天免疫细胞,对T细胞和B细胞发挥间接调节作用。例如, MSCs通过调控具有免疫抑制功能的巨噬细胞、单核细胞和树突细胞的形成,抑制效应T细胞的活化,促进调节性T细胞的产生。此外, MSCs还可以通过其产生的免疫抑制分子如一氧化氮(NO)^[8]、前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)^[21]、IDO、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)^[21]、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)^[22]、程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)^[23]、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)^[24]、血红素氧化酶1(heme oxygenase 1, HO1)^[25]、半乳糖凝集素^[26]等,对T细胞产生直接作用,例如抑制细胞毒性T细胞的活化和辅助T细胞1、辅助T细胞17(T helper 1/17 cell, TH1/17)的分化。相比于T细胞, MSCs对B细胞活化、增殖和抗体产生的影响仍处于研究的初级阶段。但已有研究显示, MSCs对难治性慢性GvHD的改善是由调节性B细胞增加而介导的^[27],表明B细胞在MSCs介导的免疫调节中也扮演重要角色。

1.2 影响MSCs免疫调节功能的因素

当与主要组织相容性抗原复合(major histocompatibility antigen complexes/human leucocyte antigen, HLA)不匹配的外周血单个核细胞共培养时,研究人员观察到MSCs表现出了明显的免疫抑制作用^[28]。将MSCs移植到患有炎症性疾病的宿主中时, MSCs也能强烈地抑制T细胞的激活和增殖,从而抑制T细胞介导的炎症反应。基于以上结果,最初,研究人员一直认为MSCs的免疫抑制功能是与生俱来的。然而,2008年, Ren等^[8]的实验表明,在没有T细胞激活信号的情况下将MSCs和T细胞共培养, MSCs并不能抑制T细胞的增殖。类似地,当MSCs与T细胞杂交瘤或T细胞母细胞共培养时(这两种细胞只增殖,不产生炎症因子), MSCs也不能抑制这两种细胞的增殖。然而将MSCs暴露于IFN γ 与TNF或白细胞介素1(interleukine 1, IL1)时, MSCs则完全抑制T细胞杂交瘤和T细胞母细胞的增殖。深入的研究表明, T细

胞激活时释放的IFN γ 协同TNF或IL1对诱导MSCs的免疫抑制功能有决定性的作用,自此,科学家们提出了MSCs的免疫抑制需要炎症因子授权的理论^[5]。

更为复杂的是,炎症因子刺激的MSCs并不总是发挥免疫抑制的作用。例如,当暴露于低水平的IFN γ 和TNF时, MSCs反而会促进免疫细胞的浸润从而促进炎症。其实实验证据来自于对GvHD和实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的研究。人们发现,在疾病开始时或复发期间——炎症水平较低的情况下,输注MSCs的治疗效果会大打折扣,甚至促进疾病的发展^[5]。这说明,组织微环境中炎症因子的水平对MSCs的免疫调节模式具有深远的影响,提示组织中炎症因子构成的变化可以影响MSCs的免疫调节特性。此外,组织微环境中细胞因子的种类也能影响MSCs的免疫抑制功能。例如TGF β 、I型干扰素、环孢素和地塞米松等,均被发现能够赋予MSCs促进炎症的能力^[29]。在小鼠肝硬化模型中, MSCs和地塞米松共同输注反而促进了纤维化的进程^[29]。这些研究结果表明,诱导MSCs的免疫抑制特性需要存在一定程度的炎症,而免疫抑制分子的存在会干扰MSCs的作用。提示在输注前将MSCs提前暴露于炎性环境或可增加MSCs的免疫抑制效果。

除炎症因子外, MSCs的免疫调节能力还受其他环境因素的影响,例如缺氧和细胞外基质组分。缺氧是炎症组织微环境的典型特征之一,并深刻地影响炎症的过程以及MSCs的免疫调节功能。例如低氧能够诱导MSCs分泌更高水平的IL、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和趋化因子^[30]。此外,低氧条件下培养的MSCs较常氧培养MSCs,具有更强的治疗EAE的能力^[4]。同时,炎症通常伴随着胶原蛋白、糖蛋白等细胞外基质组分的异常改变。而细胞外基质的组成及其3D结构亦可作为调节MSCs特性和功能的信号。例如,相比于非生理性硬表面,如常规组织培养塑料,接种在胶原蛋白3D支架中的MSCs产生更多的免疫相关因子,这些因子可以更大程度地抑制同种异体淋巴细胞的活化^[31]。这提示,来自细胞外基质的信号可能会指导MSCs的免疫调节特性。

1.3 MSCs免疫调节的机制

受细胞因子激活的MSCs产生大量趋化因子,其中大多数是CXC-趋化因子受体3(C-X-C chemo-

kine receptor type 3, CXCR3)和CC-趋化因子受体5(C-C chemokine receptor type 5, CCR5)的配体,包括CC-趋化因子配体5(C-C motif chemokine ligand 5, CCL5)、CXC-趋化因子配体9(C-X-C motif chemokine 9, CXCL9)、CXCL10和CXCL11。这些因子能够通过形成梯度的方式招募免疫细胞,诱导免疫细胞向炎症部位迁移。利用延时显微镜,研究人员观察到了T细胞可以在细胞因子激活的MSCs附近积累,同时, CXCR3或CCR5的药理学阻断剂可以阻止T细胞迁移和MSCs的免疫抑制功能,这表明, MSCs能够以CXCR3和CCR5配体依赖的方式招募T细胞到MSCs附近继而抑制T细胞功能^[8]。揭示了趋化因子-趋化因子受体相互作用在MSCs免疫调节功能中的关键地位^[8]。

除诱导MSCs中趋化因子的稳定表达之外,研究人员发现,在MSCs与外周血单个核细胞共培养实验中, IFN γ 协同TNF或IL1,同时刺激诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)(在啮齿动物中)或IDO(在人和其他哺乳动物中)的表达^[32]。iNOS参与NO的产生,而IDO是分解代谢酶,通过介导色氨酸代谢影响多种生物系统。T细胞被募集到MSCs周围后,被NO或IDO介导的代谢所抑制。具体地, iNOS催化产生的NO通过对Janus激酶(Janus kinase, JAK)信号传递和激活转录蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路的影响,导致T细胞的细胞周期停滞^[33]。而IDO可将必需氨基酸色氨酸转化为犬尿氨酸,再进一步转化为犬尿喹啉酸、邻氨基苯甲酸和其他分解代谢物。IDO对免疫细胞的确切作用尚不完全清楚,一个可能的解释是色氨酸分解代谢会降低这种必需氨基酸在微环境中的水平,从而影响免疫细胞的存活。值得注意的是, MSCs表达的IDO还可以通过其代谢产物,诱导单核细胞分化成炎症抑制型巨噬细胞(M2巨噬细胞),从而减弱炎症并促进修复过程^[34]。这些发现共同证明了趋化因子和iNOS或IDO之间的相互作用对MSCs免疫调节功能的重要意义。

除iNOS和IDO外, MSCs的免疫抑制特性还通过产生PGE₂、TSG6、HO1、半乳糖凝集素、HGF、LIF、IL6等来介导^[4,16,21-22,24-26,35]。其中,研究最广泛的是PGE₂和TSG6。例如在细胞水平上, MSCs分泌的PGE₂被发现与促进巨噬细胞分泌IL10、抑制树突状细胞成熟、抑制自然杀伤细胞的细胞毒作用,以

及通过间接机制诱导调节性细胞有关^[36]。TSG6则被发现在关节炎、心肌梗死、角膜损伤、急性肺损伤和腹膜炎小鼠模型中可以减弱炎症并增强组织修复^[15-18]。特别地, MSCs释放的TSG6可以与CD44结合并抑制中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞向发炎组织的迁移^[17]。

除可溶性因子外, MSCs还通过细胞表面分子和受体的相互作用,直接影响多种免疫细胞,从而调节免疫应答。其中最值得注意的是PD-L1^[23]。IFN γ 介导MSCs上调PD-L1的表达, PD-L1则通过与免疫细胞上表达的程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death protein 1, PD1)的结合,向活化的T细胞传递抑制信号,从而抑制T细胞增殖。因此, MSCs中PD-L1表达的下调会减弱其免疫抑制作用^[37]。

尽管MSCs具有长期的免疫调节作用,但研究表明,输注MSCs在受损组织中不会长时间存在^[3]。对此现象的一种解释是输注的MSCs会启动免疫反应,例如,激活补体系统进而诱导MSCs凋亡^[38]。有研究表明,体内C5a可诱导中性粒细胞的积聚和活化,从而损伤输注的MSCs^[39]。值得注意的是,凋亡的MSCs也具有诱导免疫抑制作用的能力。在GvHD小鼠模型中,输注MSCs可在细胞毒性免疫细胞的识别和攻击下发生细胞凋亡,而这一作用对于MSCs执行免疫抑制功能亦是必不可少的。研究发现,在GvHD模型中,机体的吞噬细胞在吞噬凋亡MSCs的过程中获得了表达高水平IDO的能力,由此而实现免疫抑制功能^[40]。值得注意的是,细胞实验表明IFN γ 和TNF——诱导MSCs免疫调节能力的主要炎症因子,亦可导致MSCs的凋亡^[41]。因此,深入理解凋亡MSCs免疫调节作用的形成方式和作用机理,对优化基于MSCs的治疗策略极其重要。

2 MSCs的临床应用现状

如前所述, MSCs具有强大的免疫调节能力,提示MSCs输注可以从调节免疫状态、促进组织修复等方面为急、慢性炎症性疾病的治疗提供策略。截止到2019年初,世界范围内在ClinicalTrials.gov上登记的MSCs相关的临床试验已超过900项,其中国内的超过190项。超过200项旨在为MSCs在多种疾病治疗中的安全性和有效性做出初步评估的研究已经完成,其中主要涉及到炎症性疾病、移植排斥、心血管疾病和器官损伤等(表1)。初步的研究数据提

表1 代表性的MSCs临床治疗案例总结(根据参考文献[14]修改)

Table 1 Representative clinical studies of MSC-based therapies (modified from references [14])

分类(登记在ClinicalTrials.gov的案例) Categories (cases registered in ClinicalTrials.gov)	代表性研究 Representative studies				
	疾病 Diseases	类型 Types	临床结果 Clinical outcomes	MSCs来源 MSCs sources	参考文献 References
Inflammatory diseases (>200 cases)	GvHD	Case report	Safe and effective for treating gastrointestinal grade IV acute steroid refractory GvHD	Allogeneic BM-MSCs	[64]
		Phase II	Ameliorated inflammation in skin, oral mucosa and liver in patients with chronic GvHD; improved survival rate of patients with acute GvHD	Allogeneic BM-MSCs, HLA-identical, mismatched or haploidentical showed similar effects	[6,27]
		Phase III	No apparent response observed	Allogeneic MSCs	[48]
	Crohn's disease	Phase II/III	No serious adverse reactions; safe and feasible; promoted anal fistula recovery	Allogeneic BM-MSCs or AD-MSCs	[7,54]
		Case report	Ameliorated disease	Allogeneic UC-MSCs or BM-MSCs	[65-66]
	Systemic lupus erythematosus	Phase I/II	No serious adverse reactions; safe and feasible; relieved disease		
Rheumatoid arthritis		Phase Ib/IIa	Safe and feasible	Allogeneic AD-MSCs	[67]
		Multiple sclerosis	Phase 1/2	Safe and feasible; induced immediate immunomodulatory effects	Autologous BM-MSCs
Diabetes and related complications (>40 cases)	Type 1 diabetes	Phase 1/2	Safe; moderate improvement of metabolic measures	Allogeneic UC-MSCs	[69]
	Type 2 diabetes	Phase 1	Safe and effective	Allogeneic placenta-derived MSC	[70]
Kidney diseases (>30 cases)	Lupus nephritis	Phase II	No apparent effect observed	Allogeneic UC-MSCs	[59]
	Diabetic kidney disease	Phase Ib/IIa	Ongoing	Allogeneic BM-MSCs	[61]
	Kidney transplantation	Phase I/II	Safe and feasible; reduced incidence of acute rejection	Autologous BM-MSCs	[71]
Cardiovascular disease (>70 cases)	Myocardial infarction	Phase I	Safe and feasible	Allogeneic BM-MSCs	[72]
	Ischaemic and non-ischaemic cardiomyopathy	Phase I/II	Safe and feasible; reduced wound size and function improvement	Autologous or allogeneic BM-MSCs	[73-74]
Liver diseases (>50 cases)	Liver fibrosis and cirrhosis	Phase I/II	Improved liver function	Autologous or allogeneic BM-MSCs	[75-76]

AD: 脂肪组织; BM: 骨髓; UC: 脐带; MSCs: 间充质干细胞。

AD: adipose tissue; BM: bone marrow; UC: umbilical cord; MSCs: mesenchymal stem cells.

示, 基于MSCs的治疗具有很好的安全性。然而值得注意的是, 尽管临床上尚缺乏MSCs输注导致严重并发症或死亡报道, 应用MSCs进行治疗时, 仍需严密监测小概率的由MSCs输注引起的不良后果^[42-44], 这包括异源MSCs引起的排斥反应、异位组织形成、

肿瘤生长促进、大量细胞输注产生的微血栓、即时血液介导的炎症反应(instant blood-mediated inflammatory reaction)等。这些不良反应的出现至少在一定程度上, 与输注MSCs的特性、数量以及病人的个体情况有关。因此, 对MSCs治疗安全性以及不良反

应的监测、预防以及及时控制等方面的研究, 仍然需要不断深入。尽管大规模严格实验尚未完成, 但已有的数据已经为MSCs治疗或减轻炎症性疾病的可能性提供了证据。接下来, 我们将通过讨论一些经典的临床试验, 阐述MSCs在这些疾病中的治疗作用。

基于MSCs的免疫抑制功能, 该细胞最初被用于治疗1例难治性GvHD, 并取得较好临床效果。此后, 相关研究团队开展了MSCs治疗类固醇抵抗型重度GvHD的二期临床试验^[6]。在治疗的55例GvHD病人中, 30人的疾病症状完全消失, 9人症状减轻。结合相关的动物实验数据, 这些研究结果提示, MSCs输注在治疗GvHD和促进供体植入方面极具应用前景^[18,27,45-47]。然而, 不是所有应用MSCs治疗GvHD的结果都是有效的^[48]。造成这种治疗效果不稳定的原因有很多。一种可能的解释是, 病人炎症状态的差异会影响MSCs的激活状态, 从而影响其免疫抑制功能的发挥。如前所述, 临床前实验表明, 具有免疫抑制功能的药物, 如类固醇激素或环孢素的施用会显著抑制MSCs的免疫抑制功能^[29,49], 而在心脏移植小鼠模型中, 低剂量环孢素的使用会削弱MSCs的治疗作用^[49]。产生这样的结果部分是由于类固醇的使用下调了MSCs赖以进行免疫调节的iNOS或IDO的表达水平^[29]。

MSCs, 尤其是脂肪来源的MSCs(adipose tissue derived MSCs, AD-MSCs), 在克罗恩肠炎的治疗上取得了显著而稳定的效果。基于AD-MSCs的免疫调节和组织修复功能, 早先研究人员发现AD-MSCs的局部注射有效促进了瘻管的恢复^[50]。随后开展的一系列临床研究表明, 无论是自体还是异体AD-MSCs, 都能安全有效地提高克罗恩病患者的恢复程度^[51-53]。令人兴奋的是, 三期临床试验结果也显示了AD-MSCs在治疗克罗恩病上的积极作用^[7], 这也是少数几个进入三期临床试验的MSCs临床研究之一。同时研究人员也尝试了其他MSCs, 如骨髓来源的MSCs(bone marrow derived MSCs, BM-MSCs)^[54], 同样地, BM-MSCs也显示了良好的治疗效果。然而, Multistem产品的1项临床试验表明, 静脉输注的MSCs对缓解溃疡性结肠炎没有明显效果^[55]。这提示, MSCs的输注途径对其治疗效果有重要的影响。

中国目前有超过1亿的肾脏病患者, 随着社会经济发展和生活方式的改变, 糖尿病肾病已经成为

了慢性肾脏病的首位致病原因^[56]。在临床前和临床研究中, MSCs同样也被广泛地应用于治疗糖尿病和肾脏疾病(表1)。实验动物模型数据显示, MSCs通过多种机制保护受损肾脏, 包括促进肾细胞存活、降低上皮细胞自噬、抑制异常的免疫反应和重塑细胞外基质等^[47,57-58]。这些临床前期研究催生了MSCs治疗肾病的开端。迄今已有多达30项临床试验涉及急性或慢性肾病、糖尿病肾病、肾移植和狼疮性肾炎。虽然其中大多数研究仍在进行之中, 但已有前期数据(如肾移植数据)提示了MSCs的良好治疗前景^[47]。同样地, 并不是所有的结果都是积极的。例如在2017年的1项小规模研究中, 研究人员并没有发现MSCs在狼疮性肾炎的治疗中有明显效果^[59]。因此, 长期的、大规模的研究以充分评估利用MSCs进行肾病治疗的安全性、可行性和有效性, 仍亟待开展。值得注意的是, 由于治疗糖尿病肾病临床前研究的成功^[60], 第一个大规模、标准化的人体临床试验——“Nephstrom”已经启动, 此项目将用以评估同种异体BM-MSCs治疗糖尿病肾病的安全性和有效性^[61]。

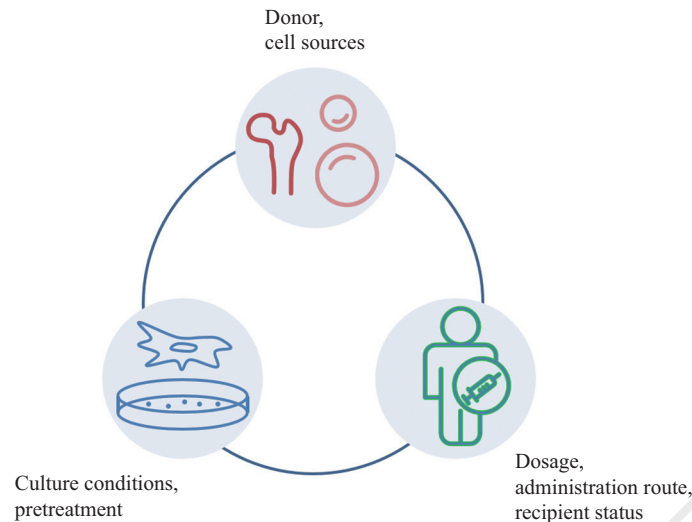
综上, 应用MSCs治疗多种炎症性疾病的临床试验提示了MSCs治疗具有很好的安全性, 并取得了令人鼓舞的进展。但是, MSCs治疗的疗效和稳定性还有待进一步的优化。关于MSCs的生物学特征、免疫调节机制以及MSCs与疾病微环境相互作用的深入研究, 仍亟待开展。

3 优化MSCs治疗的可行策略

虽然大量研究显示了MSCs具有良好的临床应用潜力, 但MSCs治疗的稳定性、可预测性仍不能令人满意。造成这种现象的重要原因之一是影响MSCs治疗诸多因素的最佳选择标准仍不清楚。其中包括MSCs捐献者的情况、受试者的状态以及MSCs的组织来源、培养条件、输注剂量、前期处理和介入方法等(图2)。

3.1 MSCs供体和组织差异性

由于更方便得到也更易大量扩增和标准化, 越来越多的临床试验更倾向于选择使用异体而不是自体MSCs。尽管自体 and 异体MSCs在GvHD、克罗恩病等多种炎症性疾病中都被证明具有治疗效果(表1), 然而, 至少有1项研究表明, 在小鼠迟发型超敏反应模型(delayed-type hypersensitivity, DTH)中, 不同



当MSCs用于临床疾病治疗时,对使用的细胞以及受试病人,都应进行严格的评估,以获得最优的治疗效果。其中, MSCs的纯度、来源、应用剂量以及是否进行预刺激以及病人的炎症状态、MSCs输注途径、治疗时间、是否使用免疫抑制剂等,需要着重考虑。

When design MSC-based therapies, various factors regarding to the cells to be used and the patients to be tested should be strictly evaluated to optimize therapeutic effects. These factors include the purification, source, application dosage and pretreatment of MSCs, the inflammatory status in patients, administration route, treatment time, and the appropriate use of immunosuppressant.

图2 影响MSCs治疗效果的关键因素

Fig.2 Considerations for MSC-based clinical applications

供体小鼠MSCs间的异质性会导致其治疗效果的差异^[62]。尽管类似的临床研究尚未开展,在选择MSCs供体时,应该要考量诸如年龄、性别、健康状态等因素。另外,临床前实验表明,不同组织来源MSCs的免疫调节能力也具有差异。虽然应用于临床试验的MSCs大多为骨髓来源,其他来源MSCs的应用也在逐步增多。例如, ClinicalTrials.gov 登记的数据显示,十年间脐带和脂肪来源MSCs的用量超过了30%。Philipp Mattar等^[63]曾对临床前实验中应用的骨髓、脂肪、脐带等来源MSCs的免疫调节特性进行了比较,他们的研究发现,不同来源的MSCs调控不同亚群免疫细胞的能力有些许差异,其中多数情况下脂肪来源MSCs的表现更好。因此,我们期待可以根据不同疾病炎症反应的类型,界定不同来源MSCs的最佳适应症。然而,目前仍缺乏针对特定临床适应症最合适的MSCs来源的研究。

3.2 MSCs的培养和预处理

在绝大部分的研究中, MSCs都培养于含有2%~10%无病原胎牛血清的完全培养基内。但在临床上,异种血清的使用无法避免潜在的安全风险,且血清批次的不同也会导致MSCs特性的不一致。因此,无血清培养基的发展是标准化MSCs生产的关键步骤。除此之外,低氧条件会诱导MSCs分泌多种

因子,如IL-6、VEGF和趋化因子等。相一致地,将MSCs培养于氧浓度低于5%的环境中能够提高其在非人灵长类心肌梗死动物模型、EAE模型中的治疗效果^[4,77]。因此, MSCs培养时的氧浓度也应受到严格的控制。此外,由于MSCs的大规模应用需要大量细胞,如何保证MSCs稳定的体外传代亦是一个极大的挑战。有趣的是,尽管体外扩增通常会损伤细胞干性,但体外扩增MSCs的免疫调节能力却能很好地保持,甚至随着传代略有升高^[78]。我们建议尽快推广成分明确的无血清培养基培养代替有血清培养方法,严格控制各种培养添加剂(如生长因子)的使用,建立严格的细胞种鉴定、扩增、保存规定,控制传代次数,尽可能地减少由于细胞培养造成的细胞和治疗效果的差异。

如前所述,炎症因子的授权对激活MSCs的免疫调节特性至关重要。利用炎症因子(如IFN γ 和TNF)对MSCs进行预处理,是提高MSCs免疫调节能力的可行方法之一。在临床前实验中,已有数据表明,用IFN γ 或IFN γ 联合TNF/IL1预处理MSCs能够提高其在DTH、肝损伤、结肠炎、GvHD、关节炎和急性局部缺血动物模型中的治疗功效^[62]。然而,利用预处理的MSCs进行人体临床试验的案例尚且缺乏。因此,急需开展基于炎症因子预处理MSCs治疗炎症性

疾病的安全性、有效性和稳定性的实验和评估。

3.3 输注策略、受试者的选择

除了MSCs自身的性质外, 输注剂量和给药方式也可能引起MSCs临床应用结果的差异。虽然临床前实验表明, MSCs会趋向于聚集在损伤组织周围, 但目前尚不清楚临床试验中注射的MSCs是否会迁移到炎症部位, 或全身性地发挥治疗效果。尽管大量研究表明, 在治疗诸如GvHD在内的炎症性疾病中, 无论是全身还是局部施用MSCs都能获得良好的治疗效果(表1)。至少有报道认为, 在治疗克罗恩肠炎时, 局部给予MSCs的治疗效果要远远好于系统性输注^[55]。这提示, 依据疾病的类型, 选择合适的输注方法(局部, 静脉或动脉输注)将有助于最优化治疗效果。

依据病人的情况, 选择合适的介入时机对于安全有效地发挥MSCs的治疗作用亦非常关键。尽管许多实验显示, MSCs不能自发成瘤, 但依旧要考虑MSCs促进肿瘤增长的可能性^[19,79]。因此, 肿瘤患者在应用MSCs时需格外注意, 甚至应避免使用MSCs进行治疗。然而, 亦有已经登记在ClinicalTrials.gov的旨在利用基因修饰MSCs进行肿瘤治疗的临床试验, 尽管项目尚未启动^[80]。此外, 由于炎症微环境在塑造MSCs的免疫调节特性时起着重要的作用, 因此受体病人的炎症状态将会影响MSCs的治疗效果。如前所述, 临床前期研究显示, 当炎症水平很高时施用MSCs将更有可能抑制GvHD, 而在疾病早期炎症水平较低的时候施用则效果较差^[8,46]。同样, 在EAE活跃期施用MSCs会比在复发期具有更好的治疗效果^[81]。甚至在某些情况(如免疫抑制剂存在的情况下), MSCs可能具有促进炎症的作用。因而为了更深入地认识炎症微环境对MSCs特性的影响, 并以此为根据优化治疗策略, 我们建议在开展MSCs治疗的临床试验时, 应准确评估参与者的炎症状态。

4 总结

MSCs是存在于骨髓、脂肪等多种组织中的多能干细胞, 除具有向脂肪、成骨细胞、软骨细胞等分化的能力外, 还拥有强大的免疫调节功能。目前的研究表明, 在炎症因子的刺激下, MSCs能够通过协调分泌趋化因子和免疫调节分子, 或细胞间接触的方式, 调节多种免疫细胞, 抑制炎症, 重建组织稳态, 从而展现出了良好的医用前景。尽管在使用

MSCs治疗多种疾病上取得了重大进展, 然而现有的基于MSCs的治疗方法大多关注于这些细胞在炎症性疾病治疗中的安全性和有效性的初步研究, 实现MSCs治疗的大规模、稳定的推广依旧存在困难。应用MSCs治疗的最佳方案, 包括供体选择、给药途径、剂量、频率、适应症、适应人群等诸多因素仍亟待确定。由于炎症在组织再生过程中对MSCs免疫调节活性的塑造起着重要的作用, 而施用MSCs后的免疫调节效果也会受免疫抑制剂的影响。因此, 发展相应的技术以准确评判病人的炎症因子水平和种类, 将有助于指导MSCs的个性化治疗, 提高治疗的有效性和准确性。此外, 这些详细的动态炎症网络的检查将会加深我们对MSCs和炎症微环境之间相互作用的理解, 并改善MSCs在炎症性疾病治疗中的应用效果。同时, 深入研究MSCs的免疫调节机制, 发现MSCs借以调节免疫反应的“干细胞因子”, 将有助于更加方便、安全、可靠地推广基于MSCs的治疗新方案。

参考文献 (References)

- 1 Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5): 639-48.
- 2 Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, *et al.* Mesenchymal stem cells are renoprotective, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(7): 1794-804.
- 3 Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, *et al.* Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1743-55.
- 4 Du L, Lin L, Li Q, Liu K, Huang Y, Wang X, *et al.* IGF-2 Preprograms maturing macrophages to acquire oxidative phosphorylation-dependent anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism* 2019; doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.006.
- 5 Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014; 15(11): 1009-16.
- 6 Le Blanc K, Frasson 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.
- 7 Panes J, Garcia-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 2016; 388(10051): 1281-90.
- 8 Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 141-50.

- 9 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.
- 10 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106(5): 1755-61.
- 11 Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(26): 11002-7.
- 12 Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 2016; 388(10051): 1281-90.
- 13 Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(4): 1175-86.
- 14 Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, *et al.* Immuno-regulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14(8): 493-507.
- 15 Mindrescu C, Dias A, Olszewski R, Klein M, Reis L, Wisniewski HG. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in DBA/1J mice expressing the TSG-6 transgene. *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46(9): 2453-64.
- 16 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.
- 17 Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* 2011; 118(2): 330-8.
- 18 Oh JY, Roddy GW, Choi H, Lee RH, Ylostalo JH, Rosa RH, Jr, *et al.* Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(39): 16875-80.
- 19 Shi Y, Du L, Lin L, Wang Y. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(1): 35-52.
- 20 Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, *et al.* Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2018; 25(7): 1209-23.
- 21 English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25 (High) forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 156(1): 149-60.
- 22 Cao W, Yang Y, Wang Z, Liu A, Fang L, Wu F, *et al.* Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity* 2011; 35(2): 273-84.
- 23 Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, *et al.* Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35(5): 1482-90.
- 24 Benkhoucha M, Molnarfi N, Dunand-Sauthier I, Merkler D, Schneider G, Bruscoli S, *et al.* Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J Immunol* 2014; 193(6): 2743-52.
- 25 Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soullillou JP, *et al.* A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 110(10): 3691-4.
- 26 Sioud M, Mobergslie A, Boudabous A, Floisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 2010; 71(4): 267-74.
- 27 Peng Y, Chen X, Liu Q, Zhang X, Huang K, Liu L, *et al.* Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5⁺ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* 2015; 29(3): 636-46.
- 28 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10): 3838-43.
- 29 Chen X, Gan Y, Li W, Su J, Zhang Y, Huang Y, *et al.* The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1009.
- 30 Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2363-70.
- 31 Yang J, Chen X, Yuan T, Yang X, Fan Y, Zhang X. Regulation of the secretion of immunoregulatory factors of mesenchymal stem cells (MSCs) by collagen-based scaffolds during chondrogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 70(Pt 2): 983-91.
- 32 Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, *et al.* Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1954-62.
- 33 Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109(1): 228-34.
- 34 Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20(1): 187-95.
- 35 Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, *et al.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(15): 8732-7.
- 36 Tataru R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, *et al.* Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy* 2011; 13(6): 686-94.
- 37 Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, *et al.* A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*

- 2008; 18(8): 846-57.
- 38 Von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, *et al.* Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* 2012; 30(7): 1575-8.
- 39 Li Y, Qiu W, Zhang L, Fung J, Lin F. Painting factor H onto mesenchymal stem cells protects the cells from complement- and neutrophil-mediated damage. *Biomaterials* 2016; 102: 209-19.
- 40 Gallego A, Riffó-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, *et al.* Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces *in vivo* recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017; 9(416): pii: eaam7828.
- 41 Li X, Shang B, Li YN, Shi Y, Shao C. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 18.
- 42 Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110(10): 3499-506.
- 43 Boltze J, Arnold A, Waleczak P, Jolkkonen J, Cui L, Wagner DC. The dark side of the force—constraints and complications of cell therapies for stroke. *Front Neurol* 2015; 6: 155.
- 44 Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen AM, Elgue G, Funke L, *et al.* Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem Cells* 2012; 30(7): 1565-74.
- 45 English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 431-42.
- 46 Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007; 21(9): 1992-9.
- 47 Casiraghi F, Perico N, Cortinovis M, Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(4): 241-53.
- 48 Baker M. Stem-cell drug fails crucial trials. *Nature* 2009; doi: org/10.1038/news.2009.894 2009.
- 49 Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Pisco P, Schlitt HJ, Geissler EK, *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006; 81(11): 1589-95.
- 50 Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(7): 1416-23.
- 51 de la Portilla F, Alba F, Garcia-Olmo D, Herreras JM, Gonzalez FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28(3): 313-23.
- 52 Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, *et al.* Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(1): 79-86.
- 53 Cho YB, Lee WY, Park KJ, Kim M, Yoo HW, Yu CS. Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: a phase I clinical study. *Cell Transplant* 2013; 22(2): 279-85.
- 54 Molendijk I, Bonsing BA, Roelofs H, Peeters KC, Wasser MN, Dijkstra G, *et al.* Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote healing of refractory perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2015; 149(4): 918-27 e6.
- 55 Athersys announces results from phase 2 study of multistem (R) cell therapy for ulcerative colitis. <http://www.athersys.com/news-releases/news-release-details/athersys-announces-results-phase-2-study-multistemr-cell-therapy> 2014.
- 56 Wang F, Yang C, Long J, Zhao X, Tang W, Zhang D, *et al.* Executive summary for the 2015 Annual Data Report of the China Kidney Disease Network (CK-NET). *Kidney Int* 2019; 95(3): 501-5.
- 57 Perico L, Morigi M, Rota C, Breno M, Mele C, Noris M, *et al.* Human mesenchymal stromal cells transplanted into mice stimulate renal tubular cells and enhance mitochondrial function. *Nat Commun* 2017; 8(1): 983.
- 58 Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M, Konari N, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep* 2016; 6: 34842.
- 59 Deng D, Zhang P, Guo Y, Lim TO. A randomised double-blind, placebo-controlled trial of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell for lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76(8): 1436-9.
- 60 The project. <http://nephstrom.eu/the-project/> 2015.
- 61 Medicine UNLo. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02585622?term=nephstrom&rank=1.2018>.
- 62 Szabo E, Fajka-Boja R, Kriston-Pal E, Hornung A, Makra I, Kudlik G, *et al.* Licensing by inflammatory cytokines abolishes heterogeneity of immunosuppressive function of mesenchymal stem cell population. *Stem Cells Dev* 2015; 24(18): 2171-80.
- 63 Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol* 2015; 6: 560.
- 64 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419): 1439-41.
- 65 Liang J, Gu F, Wang H, Hua B, Hou Y, Shi S, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation for diffuse alveolar hemorrhage in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(8): 486-9.
- 66 Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(8): 1423-9.
- 67 Alvaro-Gracia JM, Jover JA, Garcia-Vicuna R, Carreno L, Alonso A, Marsal S, *et al.* Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2017; 76(1): 196-202.
- 68 Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, *et al.* Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67(10): 1187-94.

- 69 Cai J, Wu Z, Xu X, Liao L, Chen J, Huang L, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stromal cell with autologous bone marrow cell transplantation in established type 1 diabetes: a pilot randomized controlled open-label clinical study to assess safety and impact on insulin secretion. *Diabetes Care* 2016; 39(1): 149-57.
- 70 Jiang R, Han Z, Zhuo G, Qu X, Li X, Wang X, *et al.* Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med* 2011; 5(1): 94-100.
- 71 Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, *et al.* Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012; 307(11): 1169-77.
- 72 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.
- 73 Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, *et al.* Dose comparison study of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (The TRIDENT Study). *Circ Res* 2017; 121(11): 1279-90.
- 74 Butler J, Epstein SE, Greene SJ, Quyyumi AA, Sikora S, Kim RJ, *et al.* Intravenous allogeneic mesenchymal stem cells for non-ischemic cardiomyopathy: safety and efficacy results of a phase II-A randomized trial. *Circ Res* 2017; 120(2): 332-40.
- 75 Lin BL, Chen JF, Qiu WH, Wang KW, Xie DY, Chen XY, *et al.* Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: A randomized controlled trial. *Hepatology* 2017; 66(1): 209-19.
- 76 Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, *et al.* Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology* 2016; 64(6): 2185-97.
- 77 Hu X, Xu Y, Zhong Z, Wu Y, Zhao J, Wang Y, *et al.* A large-scale investigation of hypoxia-preconditioned allogeneic mesenchymal stem cells for myocardial repair in nonhuman primates: paracrine activity without remuscularization. *Circ Res* 2016; 118(6): 970-83.
- 78 Zhuang Y, Li D, Fu J, Shi Q, Lu Y, Ju X. Comparison of biological properties of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells from early and late passages: immunomodulatory ability is enhanced in aged cells. *Mol Med Rep* 2015; 11(1): 166-74.
- 79 Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, *et al.* CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha. *Cell Stem Cell* 2012; 11(6): 812-24.
- 80 Genetically modified mesenchymal stem cell therapeutic against head and neck cancer (GX-051). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02079324>.
- 81 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106(5): 1755-61.