



程涛, 中国医学科学院&北京协和医学院院长聘教授、博士生导师。中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)所院长、中国医学科学院基础医学研究所(基础学院)院长、实验血液学国家重点实验室主任、海河实验室常务副主任、中国生理学会血液学专业委员会主任委员、中国血液病专科联盟理事长。从事血液学研究30余年,曾获国家杰青、基金委创群、中组部和教育部等多项人才项目支持。主持国家重大科学研究计划、重点研发专项和基金委重大项目等科研任务。在造血调控方面,取得系列成果:(1)发现造血干细胞(HSC)分裂增殖的分子开关和通路,提供成体干细胞体内外扩增特异分子靶点;(2)发现HSC恶变易感亚群和关键基因,为血液肿瘤诊断和防治提供新的分子标志物和干预策略;(3)发现HSC在疾病或损伤条件下的再生机制,创立改善微环境促进HSC移植后造血重建的新方法,带动其临床研究应用。在 *Science*、*Cell*、*Nature Cell Biology*、*Nature Genetics*、*Cell Stem Cell* 等高水平杂志上发表SCI论文230余篇,以第一完成人获国家自然科学基金二等奖1项,省部级奖2项。实验室网址: <http://www.skleh.ac.cn/laboratories/teaching/tutor/4261.html> 导师风采: <http://pumc.teacher.360eol.com/teacherBasic/preview?teacherId=3577>

## 体外培养对间充质干细胞生物学功能的影响

曹洋嘉 彭雪梅 张英驰 程涛\*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

**摘要** 间充质干细胞是目前应用前景最广泛的优质再生医学资源,由于其没有配型、排异等问题,极其适合于临床研究和应用。为满足临床应用的大量需求,间充质干细胞的体外大规模扩增是必需的。然而体外培养的间充质干细胞随着传代次数的增加,会产生许多生物学变化。该文对在体外连续传代的间充质干细胞的细胞和分子水平上的特征和功能变化作一综述,旨在为进一步优化细胞治疗方案做出理论参考,力求为推动干细胞产业的标准化作出贡献。

**关键词** 间充质干细胞; 体外培养; 免疫; 细胞治疗

## Effect on Biological Function of Mesenchymal Stem Cells Cultured *in Vitro*

CAO Yangjia, PENG Xuemei, ZHANG Yingchi, CHENG Tao\*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-06

\*通讯作者。Tel: 022-23909156, E-mail: taocheng@ihcams.ac.cn

国家自然科学基金(批准号: 81890990)和医科院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2021-I2M-040)资助的课题

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81890990) and the Medical Academy of Medicine and Health Science and Technology Innovation Project (Grant No.2021-I2M-040)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23909156, E-mail: taocheng@ihcams.ac.cn

**Abstract** Mesenchymal stem cells are the most widely used high-quality regenerative medicine resources, which are extremely suitable for clinical research and application due to their lack of problems such as matching and rejection. Amplification *in vitro* is necessary to meet the large demand for clinical applications. However, with the increase of passages cultured *in vitro*, mesenchymal stem cells will produce many biological changes. This review illustrated the cellular and molecular characteristics and functional changes of mesenchymal stem cells that have been continuously passed *in vitro*, aiming to establish further optimization of cell therapy and to provide theoretical reference for the research.

**Keywords** mesenchymal stem cell; *in vitro* culture; immunity; cell therapy

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种来源于中胚层的多能干细胞,它具有多向分化、免疫调节、创伤修复等多种功能,是21世纪最有潜力的干细胞治疗工具之一,目前有关MSCs的临床试验涉及上百种疾病。由于其细胞产品的异质性很强,临床治疗效果的批次差异很大,因此间充质干细胞的功能优化及产品质控是目前细胞治疗中的研究重点<sup>[1]</sup>。通常从供体中分离的细胞数量有限,为了获得足量的细胞用于临床治疗,不可避免地要将MSCs进行体外扩增培养。然而,长期体外培养会导致细胞的复制性衰老,细胞的免疫表型、旁分泌、造血支持和免疫调节等生物学特性和功能皆会发生改变。MSCs产品的质量控制和制备监管是确保其生物安全性和有效性的关键,充分了解细胞在体外制备和扩增中发生的生物学变化对临床转化和新药研发具有重要意义。本文将从不同方面来综述体外传代培养对间充质干细胞治疗潜力的影响(图1)。

## 1 细胞形态和增殖活力

体外培养初期, MSCs多呈纺锤形、丰满、立

体,有大量均匀分布的微绒毛,而至培养的中后期(第11代和第17代),细胞变得更宽大,扁平,并伸出大量的伪足,微绒毛的数量和长度也减少<sup>[2]</sup>。MSCs在长期体外培养过程中,在第9代前表现出类似水平的增殖能力<sup>[3]</sup>, 10代之后的MSCs增殖能力则显著下降<sup>[3-4]</sup>, 这种增殖能力的下降与细胞端粒长度和线粒体活性的变化无关<sup>[5]</sup>。同时研究者观察到, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例在培养过程中的逐渐增加, S期细胞比例逐渐减少; 在长期培养的后期细胞内出现较高的ROS水平, 这可能是细胞在复制分裂过程衰老的主要表现<sup>[6]</sup>。许多膜蛋白是细胞之间或细胞与周围环境之间信号通路的关键介质, 传代过程中胰蛋白酶的使用不可逆地损害了MSCs细胞表面的重要结构, 可能是导致细胞形态改变和增殖活力减弱的主要原因<sup>[7-8]</sup>。对来自6个不同供体、在相同培养条件下生长并在细胞第3、5和7代收获的人源MSCs进行了基因表达分析<sup>[9]</sup>, 结果显示, 40%的显著差异基因与细胞生长、增殖和细胞发育有关, 这证明体外传代的培养方式因缺乏体内微环境的营养和支持, 会极大地影响MSCs生长增殖相关的基因表达。不仅经

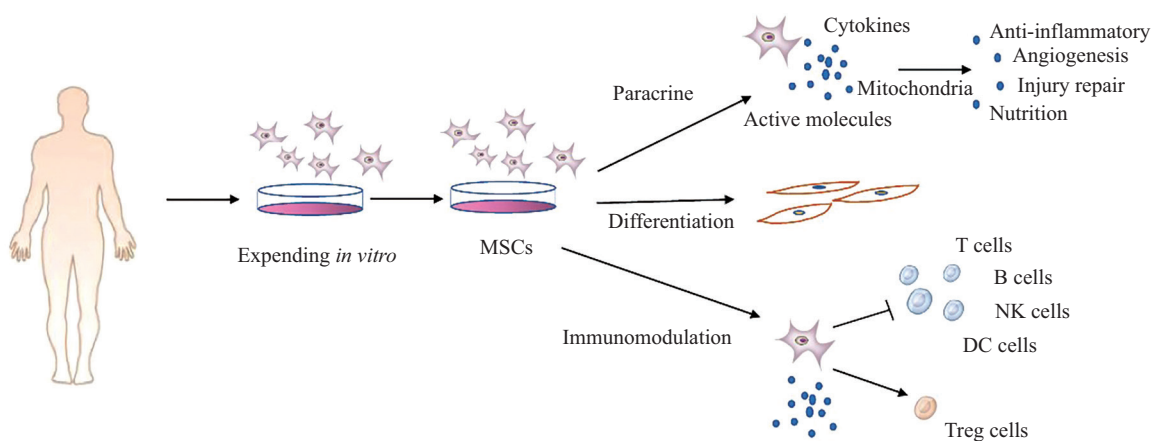


图1 间充质干细胞的治疗应用潜能

Fig1 Potential of mesenchymal stem cells for therapeutic applications

典的培养方式会产生如此效应,使用3D培养也会加速MSCs的死亡,将人源脐带MSCs长时间3D培养为球形细胞团并不能改善细胞状态,甚至会减少细胞干性,加速衰老<sup>[10]</sup>。

## 2 分化能力和归巢能力

MSCs在体外培养后,骨分化和脂肪分化之间的平衡被破坏,但这种转变的方向仍有争议。早期有大量的研究报道,传代后期氧化应激的积累和关键分化调节因子如Runx2、C/EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的失调会导致MSCs的成骨潜能的提高<sup>[11]</sup>,然而由于各实验室对于描述成骨潜能的标准缺乏统一,上述说法尚存争议。最近的一些研究评估了MSCs分化后的成骨和成脂标志物的相对表达情况,认为MSCs成骨和成脂能力会随着体外培养扩增而逐渐降低<sup>[12-13]</sup>。LOHMANN等<sup>[14]</sup>研究表明,衰老的MSCs的成骨分化倾向增加,成脂分化潜能降低。KIM等<sup>[15]</sup>则认为MSCs的成脂和成骨分化能力皆显著下降。不同培养材料会引起MSCs持久的染色质重塑,当人源MSCs在硬底物上培养时,染色质受到HAT1组蛋白乙酰化的影响而打开,而当MSCs在软底物上培养时,HDACs组蛋白去乙酰化浓缩染色质<sup>[16]</sup>。这些研究表明,细胞的分化能力异质性可能与细胞的分离、培养方式密切相关,也许进一步优化体外培养条件是提高细胞分化能力的关键。

MSCs会表达许多黏附受体和趋化因子,有助于其迁移到炎症部位起到修复和支持作用。仅培养了24 h的原代MSCs在移植后归巢能力减少到未培养状态的10%,而体外培养了48 h的原代MSCs甚至丧失了归巢能力,在靶器官中没有检测到细胞<sup>[17]</sup>。许多论文报道了MSCs在体外扩增培养过程中黏附和迁移能力下降,可能与衰老细胞分泌的细胞因子调控有关<sup>[18]</sup>。转录组分析结果显示,在长期培养的MSCs中,参与局灶黏附组织和细胞骨架翻转的基因表达下调,多种与细胞迁移相关的趋化因子、细胞因子及其受体的mRNA表达下调,如基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1, *SDF-1*)、化学细胞素受体类型4(chemokine receptor type 4, *CXCR4*)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, *VCAM-1*)<sup>[19]</sup>。利用基因工程技术增加趋化因子在MSCs中的表达能够有效地增强其趋化能力,但这种方法是否能安全地应用于人体尚需

考证。

## 3 免疫表型与免疫调节功能

体外培养的间充质干细胞缺乏特异性和独特的标记物。普遍认为,人类MSCs不表达造血标记物CD45、CD34和CD14或共刺激分子CD80、CD86和CD40,而表达不同水平的CD105、CD73和CD90。MSCs上的标记也可能会因不同的分离、培养和扩增条件或谱系分化而改变<sup>[20]</sup>。有研究表明,长期体外传代会使原本表达阳性的MSCs标记信号逐渐减弱(如CD271和VCAM-1),也会使CD73和CD146表达上调<sup>[12]</sup>,但也有研究指出在体外培养到第15代的人脐带来源的MSCs表面标记表达没有改变<sup>[21]</sup>,这些实验的差异可能与细胞本身的异质性有关。

除了强大的分化潜能外, MSCs还具有显著的抑制免疫应答的能力,其分泌人类白细胞抗原-G(human leucocyte antigen-G, HLA-G)抑制外周血单个核细胞的增殖<sup>[22]</sup>,通过接触抑制及旁分泌的方式阻止B细胞和T细胞的增殖,减弱NK细胞的活化能力,抑制树突状细胞的成熟和炎症因子的产生<sup>[23]</sup>。研究发现,尽管MSCs的表面标记物和分化能力在人脐带源性MSCs培养到第15代时保持不变,但其对调节性T细胞的促进作用以及对Th1/Th17的抑制作用显著下降<sup>[24-25]</sup>。有趣的是,如果将同一条脐带分多次分离MSCs进行培养,晚期分离的MSCs免疫调节能力反而增强<sup>[26]</sup>。在15代之前, MSCs的程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand1, PD-L1)的表达和吲哚胺2,3-双加氧酶(indolamine 2,3-dioxygenase, IDO)活性无显著差异;抑制外周血单个核细胞分泌白介素-6(interleukin-6, IL-6)、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等炎症因子的能力也无差异,但高代次细胞对IL-1 $\beta$ 的调节能力下降<sup>[25]</sup>。MSCs在炎症刺激下会表现出免疫抑制能力,但培养后的人脐带来源MSCs表现出了对T细胞增殖抑制能力的下降<sup>[5]</sup>。SEPULVEDA等<sup>[27]</sup>研究了细胞衰老如何影响人MSCs的免疫调节功能,发现衰老的MSCs保留了调节体外巨噬细胞炎症反应的能力,但抑制淋巴细胞增殖的能力减弱,这是由于它们对促炎信号的反应能力严重下降导致的。此外,培养环境中的氧张力改变也会降低MSCs的

抗炎活性<sup>[28]</sup>; 体外衰老的MSCs也会在输入体内后加剧炎症反应, 从而抵消这些细胞在体外所能观察到的抗炎作用。这些研究表明, 细胞的免疫调节异质性与其供体、培养条件以及传代导致的细胞衰老都有很大的关系。

#### 4 旁分泌功能

研究发现, MSCs的培养液也能起到和细胞输入相似的治疗效果, 但有效的培养液制剂也需要大量的MSCs培养扩增。普遍认为, MSCs通过旁分泌生长因子、抗炎细胞因子、抗菌肽、细胞器(即线粒体), 以及细胞外囊泡等来行使免疫调节、抗炎、营养支持、血管生成调节和抗凋亡功能; 通过分泌IDO和前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)等物质抑制活化的T细胞增殖功能<sup>[29]</sup>; 通过分泌IL-6、IL-8、IL-10、TGF- $\beta$ 、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factors, HGF)等免疫抑制因子, 抑制促炎的Th1和Th17细胞的发育, 刺激Treg细胞<sup>[29]</sup>。MSCs还通过影响效应T细胞中IL-4和IFN- $\gamma$ 的水平, 参与Th1/Th2平衡的调控<sup>[30]</sup>。研究表明, 微环境对MSCs的旁分泌功能影响很大, 特别是在体外培养过程中, 衰老的人源MSCs会分泌大量的IL-6和IL-8等炎症因子<sup>[31]</sup>。DI等<sup>[32]</sup>也证明了体外衰老的人源MSCs几种炎性细胞因子包括IL-6、IL-8、趋化因子8和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、金属蛋白酶3和细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecules, ICAM)-1表达水平显著增加。另有研究表明, 第9代的MSCs表达PGE2, COX-2和HGF水平都显著低于第3代的MSCs<sup>[33]</sup>, 这也说明, 传代培养中细胞的抗炎因子的旁分泌有所下降。MSCs培养中氧气的处理会增加成纤维细胞生长因子和HGF的分泌, 而降低了血管内皮生长因子的分泌<sup>[34]</sup>。这提示, 在MSCs产品的制备过程中可以通过改善培养环境有针对性地生产我们需要的细胞。

#### 5 分子生物学变化

大量研究明确了在MSCs在体外培养的过程中, 细胞的基因组、转录组以及甲基化组等方面都发生了很大的变化。SCHALLMOSER等<sup>[35]</sup>的研究发现, 在不同的体外培养条件下, 参与细胞分化、凋亡和死亡的基因表达逐渐上调, 而参与细胞有丝分裂和增殖的基因表达下调。WAGNER等<sup>[36]</sup>报道, 参与细

胞周期、DNA复制、有丝分裂和DNA修复的基因表达水平在传代后期显著降低; 与DNA复制、细胞周期调节、DNA修复、成脂分化以及脂肪酸代谢过程等过程相关基因的甲基化程度增加<sup>[37]</sup>。此外研究发现, 体外培养的MSCs高甲基化的位点和体内衰老的MSCs重叠<sup>[38]</sup>, 表明长期培养导致的细胞衰老与特定CpG位点的表观遗传学修饰有关。

#### 6 细胞治疗作用及其安全性

目前将MSCs应用于临床研究的疾病有上百种, 它可以用于改善梗死后的心功能、修复骨和软骨缺损、治疗神经退行性疾病以及帮助造血恢复、治疗或预防移植与宿主疾病等。ZHAO等<sup>[13]</sup>的研究发现, 高代次的脐带MSCs在体外表现出血液支持能力的受损, 并且在体内治疗急性移植抗宿主病的作用下降, 这可能是由于MSCs的旁分泌能力和归巢能力受损所致。在治疗急性肝衰竭大鼠的研究中, 第10代脐带MSCs组与第5代MSCs组相比, 低代次MSCs能更有效地促进肝细胞再生, 抑制细胞凋亡, 而高代次细胞移植后归巢到肝脏的效果较差<sup>[39]</sup>。目前的研究都比较支持10代之前的细胞具有较为稳定的治疗效果。通过缺氧、细胞因子、生长因子、药理制剂等预处理MSCs的方式或者改善MSCs的培养条件都可以提高治疗的有效性, 但一些预处理的方法虽然可以增强MSCs的免疫抑制能力, 但会影响MSCs的其他功能。

对于体外培养的MSCs是否具有致瘤性尚存争议, 染色体改变的意义或遗传不稳定性对治疗效果的影响也还不甚了解。研究发现, MSCs在长期培养后可能出现遗传不稳定性、致瘤性和细胞永生<sup>[40-41]</sup>, 然而主流观点依然认为染色体畸变的发生率是有限的, 有研究发现MSCs在培养过程中发生染色体畸变, 但在临床试验中观察到的低水平的非克隆性染色体畸变, 并没有导致细胞恶性转化<sup>[42-43]</sup>。最初报道MSCs致瘤的研究后来被发现可能有恶性细胞污染<sup>[44]</sup>, 但这些报道仍然无法消除人们对细胞传代后的安全性和遗传稳定性方面的担忧。毕竟脱离了体内环境, 利于细胞增殖的自发染色体畸变可能会在体外培养中成为优势种群, 恶变的风险也随之增加; 研究也证实了细胞的端粒长度在第10代之后逐渐变短<sup>[21]</sup>, 对辐射诱导的DNA损伤的识别能力明显减弱<sup>[2]</sup>, 这些结果证明体外扩增培养会增加细胞癌变的可能性。尽管有

诸多担忧,目前的研究大部分仍然支持15代以内的细胞是相对遗传稳定的<sup>[45]</sup>,尚有研究报道体外培养过程中抑癌基因*p53*、*p16*表达并无明显变化,而癌基因*p27*表达反而下调<sup>[5,46]</sup>。已经有很多临床试验证明,大剂量输入MSCs没有发生显著的副作用或不良事件发生<sup>[47]</sup>,这都证明了体外培养的MSCs应用与临床是相对安全的。然而,探索优化MSCs治疗有效性和安全性尚且任重道远,应严格管理细胞培养环境,优化培养条件,持续进行干细胞基因组完整性及癌基因的检测,尽可能降低其在体外培养阶段的恶变风险。

## 7 展望

间充质干细胞治疗在临床应用中具有广阔的天地,细胞制备的标准化方案和质量控制是临床转化的先决条件。为此,必须建立更加严格的MSCs质量控制标准,确保干细胞治疗的可重复性、安全性和有效性。目前由于取材方式、培养条件、储存方法,以及供体差异等各种原因导致MSCs的批次间差异很大,如何保持MSCs功能的一致性?如何挑选出功能优势的细胞亚群?如何对抗细胞的生长阻滞和衰老?如何过滤体外扩增后的衰老细胞?传代过程中有怎样的细胞亚群变化?这些问题都需要我们投入更加深入的研究。基因修饰、优化间充质干细胞培养条件以及寻找质控标志物可能是改善间充质干细胞临床应用的效果的关键策略。此外, MSCs在应用中的安全性和有效性是应该重点关注的问题。人工干预是否会对MSCs产生不利影响?如何挑选出细胞活力强、治疗能力优越且安全性高的细胞?相信在大数据的时代,随着对MSCs细胞生物学更加深入的研究,找到可靠的MSCs优化方法和质控标准指日可待。

### 参考文献 (References)

- [1] ZHAO Q, HAN Z, WANG J, et al. Development and investigational new drug application of mesenchymal stem/stromal cells products in China [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, doi: 10.1002/sctm.21-0083.
- [2] HLADIK D, HÖFIG I, OESTREICHER U, et al. Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent recognition of DNA breaks and increases genetic instability [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 218.
- [3] OTTE A, BUCAN V, REIMERS K, et al. Mesenchymal stem cells maintain long-term *in vitro* stemness during explant culture [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(12): 937-48.
- [4] DELBEN P B, ZOMER H D, ACORDI DA SILVA C, et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells from face and abdomen undergo replicative senescence and loss of genetic integrity after long-term culture [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 406(1): 112740.
- [5] DE WITTE S F H, LAMBERT E E, MERINO A, et al. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(7): 798-807.
- [6] GU Y, LI T, DING Y, et al. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5207-15.
- [7] AZARI H, RAHMAN M, SHARIFIFAR S, et al. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay [J]. *J Vis Exp*, 2010, (45): 2393.
- [8] TRUONG N C, BUI K H T, VAN PHAM P. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1084: 109-28.
- [9] BELLAYR I H, CATALANO J G, LABABIDI S, et al. Gene markers of cellular aging in human multipotent stromal cells in culture [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 59.
- [10] KAMINSKA A, WEDZINSKA A, KOT M, et al. Effect of long-term 3D spheroid culture on WJ-MSC [J]. *Cells*, 2021, 10(4): 719.
- [11] BRUDER S P, JAISWAL N, HAYNESWORTH S E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 278-94.
- [12] QIAN H, LE BLANC K, SIGVARDSSON M. Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 25795-807.
- [13] ZHAO Q, ZHANG L. Systematic comparison of hUC-MSCs at various passages reveals the variations of signatures and therapeutic effect on acute graft-versus-host disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 354.
- [14] LOHMANN M, WALENDA G, HEMEDA H, et al. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37839.
- [15] KIM M, KIM C, CHOI Y S, et al. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects [J]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133(5): 215-25.
- [16] KILLAARS A R, GRIM J C, WALKER C J, et al. Extended exposure to stiff microenvironments leads to persistent chromatin remodeling in human mesenchymal stem cells [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(3): 1801483.
- [17] ROMBOUTS W J C, PLOEMACHER R E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture [J]. *Leukemia*, 2003, 17(1): 160-70.
- [18] JUNG E M, KWON O, KWON K S, et al. Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(1): 463-9.

- [19] WANG S, WANG Z, SU H, et al. Effects of long-term culture on the biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 557-74.
- [20] UDER C, BRÜCKNER S, WINKLER S, et al. Mammalian MSC from selected species: features and applications [J]. *Cytometry A*, 2018, 93(1): 32-49.
- [21] PANWAR U, MISHRA K, PATEL P, et al. Assessment of long-term *in vitro* multiplied human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells prior to their use in clinical administration [J]. *Cells Tissues Organs*, 2021, 210(4): 239-49.
- [22] KIM J H, JO C H, KIM H R, et al. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells from the periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 1-12.
- [23] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726-36.
- [24] DE WITTE S F H, LAMBERT E E, MERINO A, et al. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(7): 798-807.
- [25] 常铖, 刘梦婷, 张权, 等. 长期传代培养人脐带间充质干细胞免疫调节功能的比较[J]. *中国细胞生物学学报*(CHANG C, LIU M T, ZHANG Q, et al. comparison of immunomodulatory function in human umbilical cord mesenchymal stem cells after long-term expansion [J]. *Chin J Cell Biol*), 2020, 42(4): 609-19.
- [26] SELICH A, ZIMMERMANN K, TENSPOLE M, et al. Umbilical cord as a long-term source of activatable mesenchymal stromal cells for immunomodulation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 285.
- [27] SEPÚLVEDA J C, TOMÉ M, FERNÁNDEZ M E, et al. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(7): 1865-77.
- [28] HU C, LI L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1428-42.
- [29] ZHOU Y, YAMAMOTO Y, XIAO Z, et al. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(7): 1025.
- [30] LU X, CUI J, CUI L, et al. The effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation on endometrial receptivity are associated with Th1/Th2 balance change and uNK cell expression of uterine in autoimmune premature ovarian failure mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 214.
- [31] SKOLEKOVA S, MATUSKOVA M, BOHAC M, et al. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14(1): 1.
- [32] DI G H, LIU Y, LU Y, et al. IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113572.
- [33] 杨舟鑫, 及月茹, 韩之波, 等. 长期体外扩增降低胎盘绒毛膜间充质干细胞的免疫调节功能[J]. *中国实验血液学杂志*(YANG Z X, JI Y R, HAN Z B, et al. Long term *in-vitro* expansion reduces immune modulation function of placental chorionic villi mesenchymal stem cells [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*), 2013, 21(6): 1552-6.
- [34] KAWASAKI H, GUAN J, TAMAMA K. Hydrogen gas treatment prolongs replicative lifespan of bone marrow multipotential stromal cells *in vitro* while preserving differentiation and paracrine potentials [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(3): 608-13.
- [35] SCHALLMOSER K, BARTMANN C, ROHDE E, et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions [J]. *Haematologica*, 2010, 95(6): 867-74.
- [36] WAGNER W, BORK S, LEPPERDINGER G, et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells [J]? *Aging*, 2010, 2(4): 224-30.
- [37] CHOI M R, IN Y H, PARK J, et al. Genome-scale DNA methylation pattern profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells in long-term culture [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(8): 503-12.
- [38] BORK S, PFISTER S, WITT H, et al. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(1): 54-63.
- [39] ZHANG Y, LI Y, LI W, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells at various passages on acute liver failure in rats [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 1-11.
- [40] RUBIO D, GARCIA-CASTRO J, MARTÍN M C, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3035-9.
- [41] TOLAR J, NAUTA A J, OSBORN M J, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 371-9.
- [42] BARKHOLT L, FLORY E, JEKERLE V, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies-bridging scientific observations and regulatory viewpoints [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(7): 753-9.
- [43] SENSEBÉ L, TARTE K, GALIPEAU J, et al. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(1): 9-10.
- [44] TORSVIK A, RØSLAND G V, SVENDSEN A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track-letter [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15): 6393-6.
- [45] CHEN G, YUE A, RUAN Z, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98565.
- [46] JIN L, LU N, ZHANG W, et al. Altered properties of human adipose-derived mesenchymal stromal cell during continuous *in vitro* cultivation [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(4): 657-67.
- [47] MATTHAY M A, CALFEE C S, ZHUO H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7(2): 154-62.