

# 人脐带间充质干细胞药物异质性 受供者因素影响的研究

吴艳 刘赢滢 姜舒 张芸 赵传鑫 谢亮 邹沛华 江颖纯\*

(深圳市茵冠生物科技有限公司, 深圳 518107)

**摘要** 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因其易于分离、扩增, 分化潜能大, 增殖能力强, 可规模化生产, 免疫原性低等特点, 有望成为最具临床应用前景的干细胞药物。随着人脐带间充质干细胞药物上市注册申报提上日程, 供者差异导致的质量、临床疗效不均一性成为药品上市的桎梏之一。因此, 该文就供者各种因素(母体年龄、体重、分娩方式、孕周、妊娠并发症、胎儿体重、性别)差异对人脐带间充质干细胞的影响及可能的解决方案进行总结, 从而为人脐带间充质干细胞药物发挥稳定疗效提供思路, 为产品上市扫清障碍。

**关键词** 供者多样性; 间充质干细胞; 脐带; 异质性

## Effect of Donor Factors on Drug Heterogeneity of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

WU Yan, LIU Yingying, JIANG Shu, ZHANG Yun, ZHAO Chuanxin, XIE Liang, ZHOU Peihua, JIANG Yingchun\*  
(Shenzhen Wingor Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518107, China)

**Abstract** hUC-MSCs (human umbilical cord mesenchymal stem cells), characterized by their ease of isolation and expansion, significant differentiation potential, robust proliferative capacity, scalability in production, and low immunogenicity, hold great promise as one of the most clinically promising stem cell drugs. As the application for marketing authorization of hUC-MSC-based drugs is being put on the agenda, the inconsistency in quality and clinical efficacy due to donor variability has emerged as one of the major constraints for drug commercialization. Therefore, this article provides a comprehensive summary of the impact of various donor factors, including age, gestational age, fetal weight, gender, obesity, mode of delivery, on hUC-MSCs. It also explores potential solutions to address these issues. By doing so, the study aims to offer insights into achieving consistent therapeutic efficacy of hUC-MSC-based drugs and clearing obstacles for product commercialization, ultimately paving the way for the widespread application of these promising stem cell therapies.

**Keywords** donor diversity; mesenchymal stem cells; umbilical cord; heterogeneity

干细胞是一类拥有不同分化潜能, 并在非分化状态下自我更新的细胞<sup>[1]</sup>。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能、成体干细胞。

1991年, 美国生物学家CAPLAN<sup>[2]</sup>首次从骨髓基质的支持性组织中分离出一些成体干细胞, 这些细胞可分化成软骨、骨和脂肪组织, 并可为造血干细胞

收稿日期: 2024-12-26

接受日期: 2025-02-14

深圳市科技计划(批准号: KJZD20240903101300002)资助的课题

\*通信作者: Tel: 0755-66835786, E-mail: yingchun@wingor.net

Received: December 26, 2024

Accepted: February 14, 2025

This work was supported by the Shenzhen Science and Technology Program (Grant No.KJZD20240903101300002)

\*Corresponding author. Tel: +86-755-66835786, E-mail: yingchun@wingor.net

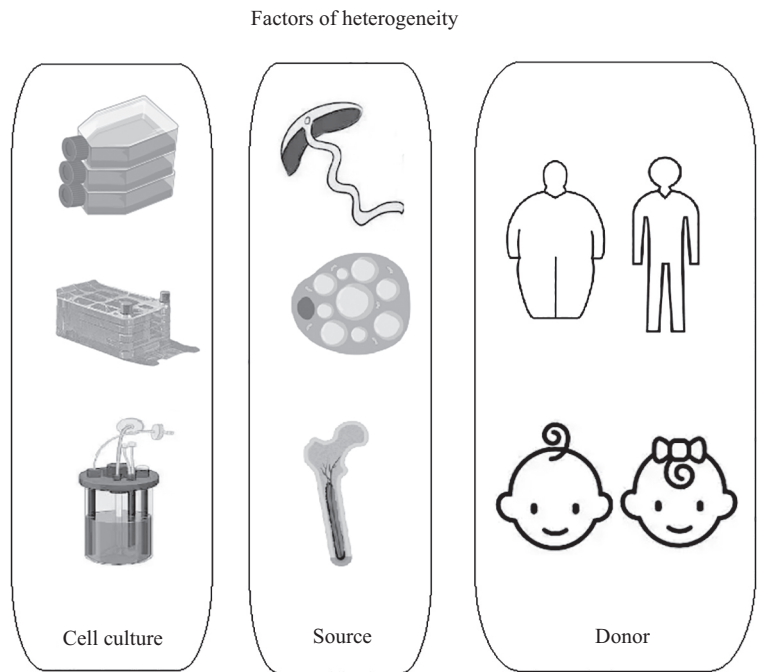


图1 导致MSCs异质性的因素  
Fig.1 Illustration of factors inducing MSCs heterogeneity

发育成各型血细胞提供所需信号因子,被命名为间充质干细胞。MSCs具有旁分泌抗炎因子和向炎症损伤部位归巢的能力。此外, MSCs细胞表面没有主要组织相容性复合物II型(major histocompatibility complex II, MHCII)和共刺激分子表达,因而免疫原性较低。这些特点使得MSCs在自体免疫性疾病和退行性疾病的治疗方面具有应用价值<sup>[3]</sup>。

目前研究较多的 MSCs主要来源于骨髓、脐血、脐带、外周血和脂肪组织,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因获取过程为非侵入性,来源丰富、取材方便<sup>[4]</sup>而成为干细胞药品研制的主要来源。尽管全球范围内进行了众多临床研究,但只有约10个MSCs产品在韩国、加拿大、美国等国家获得批准上市<sup>[5]</sup>。截至2025年1月,中国有20多家企业已获得人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)药品的临床试验默示许可(investigational new drug, IND),其中铂生卓越生物科技(北京)有限公司的人脐带间充质干细胞(商品名:艾米迈托赛注射液)于2015年1月附条件批准上市。同时,美国FDA 2024年12月18日批准Mesoblast公司的首款间充质干细胞产品Ryoncil上市。

1 人脐带间充质干细胞异质性

近年来针对各种人类疾病的 MSCs临床试验

难达预期, MSCs的异质性是影响因素之一,这种异质性表现为MSCs表型、倍增时间、免疫抑制潜力、基因表达、增殖、分化和集落形成能力(colony stimulating factor, CSF)的差异,导致异质性的原因除组织来源差异之外,主要为供者因素,如年龄、性别等;非供者因素,如培养条件、培养基成分、细胞代次、培养时间等<sup>[6-9]</sup>(图1)。同时,我国最新发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)2023》强调了供者差异对产品质量的潜在影响。为分析和解决人脐带间充质干细胞的异质性,推动其上市进程,本文就脐带供者因素,总结近几年国内外发表的hUC-MSCs的供者因素差异(母体年龄、体重、分娩方式、孕周、妊娠并发症,胎儿体重、性别,图2),对hUC-MSCs特性的影响及可能的解决方案进行综述。

2 脐带供者因素

2.1 供者母体

2.1.1 年龄 脐带是连接胎儿与孕妇胎盘的纽带,胎儿通过它从母体获取营养和氧气。hUC-MSCs基本特性(繁殖、集落形成和分化潜力)受到母体供者年龄的影响。HUANG等<sup>[10]</sup>研究发现,相较于年轻组(19~25岁, n=5), 年长组(29~35岁, n=5)母体供者脐带制备的hUC-MSCs增殖和集落形成能力下降。

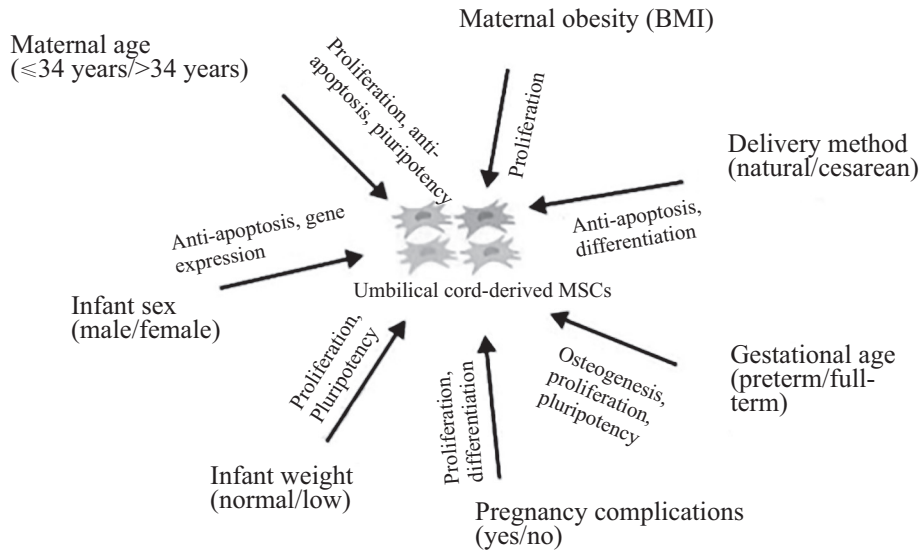


图2 可能导致hUC-MSCs异质性的供者因素

Fig.2 Donor factors that may contribute to hUC-MSCs heterogeneity

培养第7至14天,年轻组hUC-MSCs快速生长,细胞增殖率较高,而年长组hUC-MSCs生长速度开始下降,生长曲线达到平台期;年轻组和年长组hUC-MSCs的集落形成率无显著差异(68.25% vs 65.28%),同时,细胞形态显示,年轻组的hUC-MSCs集落形成能力更好,可能具有更高的增殖能力;年长组的hUC-MSCs成骨潜力下降(成骨率,年轻组vs年长组: 35.45% vs 17.33%),但成脂潜力增加(成脂率,年轻组vs年长组: 13.27% vs 29.24%);阳性标志物(CD44、CD90和CD105)两组无显著性差异,但年轻组更高。另一项研究发现,MSCs标志物CD105和CD29的表达水平随着供者( $n=20$ )年龄的增长而下降,导致差异的原因可能为年龄较大供者的器官功能状态下降,提供能够支持hUC-MSCs发育的微环境质量下降<sup>[11]</sup>。

研究发现,随着母体年龄增长,hUC-MSCs中含杆状病毒IAP重复蛋白2和3(*BIRC2*和*BIRC3*)基因表达水平降低<sup>[12]</sup>,这些基因属于凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族,有助于抑制细胞凋亡,维持细胞生存。在 $\leq 34$ 岁女性( $n=42$ )中,*BIRC2*基因表达量是 $>34$ 岁女性( $n=13$ )的4.5倍以上,*BIRC3*基因表达量是其14倍以上,*BIRC5*基因表达量几乎是2倍。高表达的*BIRC3*和*BIRC5*基因表明细胞具有较强的抗凋亡能力和干细胞特性,以及较大的分化潜力。另一项研究( $n=30$ )发现,多能转录因子性别决定区Y框蛋白2(SRY-related HMG-box 2,

*SOX2*)在hUC-MSCs中的表达水平随母体年龄的增长显著降低<sup>[13]</sup>。在 $\leq 34$ 岁的女性中,*SOX2*基因的表达水平显著高于 $>34$ 岁的女性。*SOX2*参与细胞分化、决定细胞命运以及维护未分化细胞,同时,增强细胞的多能性。

**2.1.2 体重** BADRAIQ等<sup>[14]</sup>研究发现,来自肥胖供者的hUC-MSCs表现出更长的群体倍增时间,同时有更强的免疫抑制活性。相较于健康非肥胖(BMI=21~25,  $n=7$ )供者,肥胖供者(BMI $>30$ ,  $n=7$ )的hUC-MSCs平均生长时间无显著差异,然而群体倍增时间略长,并且前34小时内细胞增殖速度明显慢于非肥胖组;肥胖供者的MSCs中CD56表达水平较低,对外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)增殖的免疫抑制作用更强,这可能与肥胖供者的代谢状态改变有关。肥胖供者中含patatin样磷脂酶结构域蛋白7(patatin-like phospholipase domain containing protein 7, PNPLA7)表达水平低于非肥胖组,PNPLA7是一种与胰岛素和葡萄糖调节相关的溶解性磷酸酶,参与脂质代谢与能量代谢。尽管供者肥胖对hUC-MSCs影响有限,但肥胖相关的代谢环境可能影响其在细胞治疗中的应用。

**2.1.3 分娩方式(自然分娩/剖宫产)** GIL-KULIK等研究<sup>[12]</sup>发现,自然分娩( $n=19$ )的hUC-MSCs中,*BIRC2*基因的表达水平是剖宫产( $n=36$ )的近3倍,*BIRC5*基因的表达水平超过3.5倍,*BIRC3*基因表达

水平略高。特别是 *BIRC5* 基因, 它还与干细胞的多能性和分化有关, 表达量越高, 细胞的干性越强, 分化潜力越大。因此, 从自然分娩的年轻女性获取的 hUC-MSCs 具有更强的抗细胞凋亡能力和干性, 具有更好的治疗潜力和临床应用价值。

**2.1.4 孕周(足月/早产)** PENOLAZZID 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 早产儿(孕周 < 37 周,  $n=11$ ) hUC-MSCs 的成骨标志物成骨特异性转录因子 2(runt-related transcription factor 2, RUNX-2) 表达水平低于足月儿( $n=9$ ), 且成骨培养 21 天无矿化, 而足月儿 hUC-MSCs 从第 14 天起矿化水平高。因此, 骨相关疾病治疗应优先使用足月儿 hUC-MSCs。

AVERCENC-LEGER 等<sup>[16]</sup>、HONG 等<sup>[17]</sup> 研究发现, 健康足月婴儿( $n=50$ ) hUC-MSCs 显示出较高的细胞增殖能力。然而, 在早产儿( $n=13$ ) hUC-MSCs 中检测到八聚体结合转录因子 4A(octamer-binding transcription factor 4A, OCT4A) 和性别决定区 Y 框蛋白 17[SRY (sex determining region Y)-box 17, SOX17] 蛋白, 在足月(孕周  $\geq 37$  周,  $n=9$ ) hUC-MSCs 中未检测到。OCT4A 和 SOX17 能调节细胞干性, OCT4 在维持干细胞的多向分化潜能和自我更新中发挥着至关重要的作用, 其也是产生诱导多能干细胞的必要因子。早产儿 hUC-MSCs 显示出更高的多能性潜能, 随着妊娠的进展, MSCs 多能性潜能受到限制。因此, 早期妊娠来源的 hUC-MSCs 可能更适合再生医学应用。

MINTEMURRO 等<sup>[18]</sup> 研究显示, 早产儿( $n=24$ ) hUC-MSCs 能表达阶段特异性胚胎抗原 -4(stage-specific embryonic antigen-4, SSEA-4)、RUNX1 和 OCT-4 等胚胎细胞标志物, 并具有分化成多种细胞类型的能力, 同时, SOX2 表达水平较高, 尤其在孕周较短时。因此, 早产儿脐带可能是多能细胞的一个重要来源。

**2.1.5 妊娠并发症** 在妊娠期间, 胎儿的器官发育处于高度活跃状态, 这一过程与母体的新陈代谢活动紧密相连。母体糖尿病可引起血管异常, 导致血管病变, 影响胎儿生长和组织灌流。KARACA 等<sup>[19]</sup> 研究发现, 相较于健康供者( $n=7$ ), 妊娠糖尿病(GDM)( $n=7$ ) 供者的 hUC-MSCs 标志物 CD90、CD44、CD105 和 CD73 阳性的细胞数量增加, 而慢性糖尿病合并肾病血管并发症(chronic diabetes who developed nephropathy as vascular complication, VC-

PGDM) 组 CD90、CD44、CD105 和 CD73 阳性的细胞数量则显著减少; 脐带的形态学结果显示, GDM 组因华通氏胶增厚导致脐带直径显著增加, 从而 GDM 组的干细胞数量增加, 但质量和数量随着传代数的增加而下降, 另 GDM 组脐带血管直径没有变化。在 VC-PGDM 组中, 长期高血糖导致血管壁增厚, 间接使得脐带直径缩小, 从而导致华通氏胶量和干细胞数量减少。同时, GDM 组和 VC-PGDM 组的细胞更易凋亡。

MOMTANUCCI 等<sup>[20]</sup> 研究发现, 相较于健康组, 糖尿病母体( $n=20$ ) hUC-MSCs 的 CD90、CD117 和干细胞因子(stem cell factor, SCF) 的表达水平以及结合指数均低; hUC-MSCs 的生长速度慢, 增殖率低, 达到生长平台期的细胞数量低; 诱导成脂标志物 *FABP4* 和神经元分化标志物 *TUB3* mRNA 的表达量低于健康组, 成骨分化潜能较弱, 可能因为糖尿病母体的子宫环境显著不同于正常情况。因此, 从糖尿病母体中提取的 hUC-MSCs 不适用于细胞临床治疗。

## 2.2 胎儿

**2.2.1 体重** GIL-KULIK 等<sup>[13]</sup> 研究发现, *SOX2* 表达水平与胎儿出生体重呈负相关, 体重低则 *SOX2* 基因表达水平高。*SOX2* 是一种多功能的转录因子, 在干细胞的多种功能中扮演着关键角色, 同时, *SOX2* 能够与其他转录因子协同作用, 从而调控细胞的生长与存活。*SOX2* 的高表达与干细胞的多能性、自我更新能力以及增殖特性紧密相关, 这可能还会增强细胞的迁移和黏附能力, 并对旁分泌特性产生影响<sup>[21-23]</sup>。同时, 研究发现, 成骨细胞标志物 *RUNX-2* 表达水平随着婴儿体重的减轻而下降, 表明婴儿体重影响 hUC-MSCs 的成骨分化<sup>[15-16]</sup>。hUC-MSCs 的细胞产量和新生儿体重相关<sup>[24]</sup>, 出生体重  $\geq 3.33$  kg 和  $< 3.33$  kg 的供者脐带制备的细胞产量有显著差异( $2.86 \times 10^6/\text{mL}$  vs  $2.13 \times 10^6/\text{mL}$ ,  $P=0.017$ ,  $n=100$  vs 101)。

**2.2.2 胎儿性别** BALZANO 等<sup>[25]</sup> 首次证实了干细胞基因的表现遗传调控和性别之间存在特定关系。男婴( $n=6$ ) 脐带制备的 hUC-MSCs 中的 *OSC4* 和 DNA 甲基转移酶 1(recombinant DNA methyltransferase 1, *DNMT1*) 基因的表达水平显著高于女婴( $n=6$ )。*DNMT1* 是关键的表现遗传基因, *OSC4* 诱导 *DNMT1* 表达, 维持 DNA 甲基化, 抑制衰老和发育相关基因



表达,保持细胞增殖和未分化状态。但男婴hUC-MSCs中*OSC4*和*DNMT1*高表达导致细胞分化快,干性减弱,组织修复能力弱。DNA甲基化与正常精子产生相关,相关基因突变可能导致精子产生障碍。因此,男婴hUC-MSCs可用于诊断与精子产生障碍相关疾病。

性别差异对特定mRNA水平影响研究表明,不同性别来源( $n=12$ )的hUC-MSCs在涉及成脂和成骨分化的miR-145-5p和miR-185-3p水平上无显著差异<sup>[26]</sup>,因此,性别对成骨和成脂分化的影响不大。然而,女婴hUC-MSC中自噬标志物LC3 II/I比率较高,提示自噬在女婴细胞分化中可能更为活跃<sup>[27]</sup>。

ZHANG等<sup>[28]</sup>研究了异卵双胞胎脐带来源的hUC-MSCs( $n=10$ )的特性。不同性别hUC-MSCs在表型和多谱系分化潜力上相似,但男婴hUC-MSCs的细胞增殖和成脂分化能力更强,细胞群体倍增时间更短;成骨分化能力相当,关键基因*NANOG*、编码端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)、*OSC4*和*SOX2*的表达水平更高,血管生成因子表达上调,细胞因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-8和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ )表达水平较低,而IL-17A和IL-10较高。在Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)刺激下,男婴hUC-MSCs的免疫调节因子表达水平显著增加。炎症环境下,男婴hUC-MSCs的免疫调节作用更有效。同时,男婴hUC-MSCs中Y染色体相关基因*KDM5D*表达水平较高。另一项研究发现,男婴hUC-MSCs中*BIRC2*和*BIRC3*基因表达量比女性高,尽管幅度不显著,但这表明抗细胞凋亡能力可能存在性别差异<sup>[12]</sup>。

### 3 解决脐带供者异质性的可能方案

#### 3.1 根据治疗目的筛选最佳供者

hUC-MSCs是治疗多种疾病的潜在细胞。其关键特性,包括增殖、分化和免疫抑制功能,对临床效果至关重要。为保证疗效,针对特定疾病,选择合适的具有治疗优势的供者是很必要的(表1)。

根据上表供者因素对干细胞质量指标的影响程度来分,供者年龄影响最大,其次为孕周、新生儿体重、新生儿性别、母体肥胖和分娩方式。hUC-MSCs的增殖能力和克隆性受供者年龄、性别和胎儿体重影响<sup>[29,30]</sup>。年轻供者的hUC-MSCs增殖率高<sup>[6]</sup>,

适合骨科和组织工程治疗。年长供者的hUC-MSCs更适合脂肪组织相关疾病。肥胖供者不推荐用于细胞治疗。理想来源是BMI正常、健康、年轻母体的足月新生儿脐带。早产儿和低体重儿脐带在多功能转录因子表达上有优势,可作为多能干细胞来源。新生儿性别差异在特定疾病治疗中提供优势。

#### 3.2 MSCs标准化策略

单个供者的MSCs具有独特的特征和生物学活性,因此,采用统一供者筛选标准的MSCs仍存在明显的个体差异。而细胞治疗产品需要稳定、统一的生物学特征来实现一致的治疗效果。显然,早期国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)的MSCs通用要求已不能满足要求,需根据治疗目标评估其所需的MSCs特定活性,例如分化潜力、免疫表型、分泌能力和血管生成能力。

3.2.1 利用药效模型来筛选特定功能的MSCs XIE等<sup>[31]</sup>提出根据疾病机制和治疗策略,结合ISCT的MSCs通用要求(I类标准)和企业内部控制(II类标准),为特定疾病制定MSCs的III类标准,即从个体差异中筛选最佳种子细胞。从12个供者hUC-MSCs中,选出3个免疫调节作用不同的hUC-MSCs细胞株,并在肝纤维化模型小鼠上进行疗效验证,最终确定高Treg促进作用的细胞株治疗效果最佳,作为肝纤维化治疗的种子细胞。

BAI等<sup>[32]</sup>研究发现,程序性死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)表达水平与MSCs对CD4<sup>+</sup> T细胞增殖的抑制作用和Treg细胞产生的促进作用呈正相关,并在自身免疫性肝炎小鼠模型中进行了验证,PD-L1高表达的hUC-MSCs治疗效果更佳,促炎因子分泌较低,抗炎因子较高。因此,PD-L1表达水平可作为hUC-MSCs治疗自身免疫性疾病的效力指标。

研究发现,不同供者hUC-MSCs对BV2细胞增殖具有不同的抑制能力<sup>[33]</sup>。在脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)动物模型中,研究结果验证了hUC-MSCs的治疗效果与其对小鼠小胶质细胞BV2增殖抑制的能力呈正相关<sup>[34]</sup>,对BV2细胞增殖抑制力高的hUC-MSCs在改善后肢运动功能方面具有更好的治疗效果,可增加神经损伤后保护机制关键基因*Zbtb16*、*Per3*和*Hif3a*的表达水平。因此,筛选对BV2细胞增殖抑制力高的hUC-MSCs,有助于提高治疗急性脊髓损伤疾病的疗效。

表1 不同供者因素对hUC-MSCs的影响及临床应用建议  
Table 1 Influence of different donor factors on hUC-MSCs and suggestions for clinical application

| 供者因素<br>Donor factors          | 影响<br>Effect       |                    |                            |                       |               |                |                     | 临床应用建议<br>Clinical application suggestions |                      | 参考文献<br>References                                                                                                                                                                                                                           |               |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|----------------|---------------------|--------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|                                | Effect             |                    |                            |                       |               |                |                     |                                            |                      |                                                                                                                                                                                                                                              |               |
|                                | 成骨<br>Osteogenesis | 成脂<br>Adipogenesis | 细胞增殖<br>Cell proliferation | 抗凋亡<br>Anti-apoptosis | 标志物<br>Marker | 免疫<br>Immunity | 多能性<br>Pluripotency | 组织修复<br>Tissue repair                      | 血管生成<br>Angiogenesis |                                                                                                                                                                                                                                              |               |
| Maternal age (n=102)           | +                  | +                  | +                          | +                     | +             | +              | +                   | NA                                         | NA                   | It is advisable to screen relatively young donors. In cases of diseases associated with adipogenic function, older donors may be considered                                                                                                  | [10-13,29-30] |
| Gestational age (n=114)        | +                  | NA                 | +                          | -                     | +             | NA             | +                   | NA                                         | NA                   | In the field of bone repair treatment, full-term donors should be selected. Preterm umbilical cords can be a source of multipotent stem cell tissues                                                                                         | [15-18]       |
| Infant weight (n=232)          | +                  | NA                 | +                          | -                     | NA            | NA             | +                   | NA                                         | NA                   | Normally, donors with normal body weight are selected. In fields where the requirements for differentiation are low and those for proliferation are high, such as skin transplantation, donors with relatively lower body weight can be used | [13,24,29]    |
| Infant sex (n=34)              | +                  | +                  | +                          | +                     | NA            | NA             | +                   | +                                          | +                    | For donors, it is advisable to select those who gave birth naturally. However, in the area of bone repair treatment, there are no such restrictions                                                                                          | [25,28-29]    |
| Maternal obesity (n=14)        | -                  | -                  | +                          | NA                    | +             | -              | NA                  | NA                                         | NA                   | It is recommended to select donors with a normal BMI (body mass index)                                                                                                                                                                       | [14]          |
| Delivery method (n=55)         | -                  | NA                 | NA                         | +                     | NA            | NA             | NA                  | NA                                         | NA                   | For donors, it is advisable to select those who gave birth naturally. However, in the area of bone repair treatment, there are no such restrictions                                                                                          | [12,15]       |
| Pregnancy complications (n=34) | +                  | +                  | +                          | NA                    | +             | +              | NA                  | NA                                         | NA                   | Clinical application is not recommended                                                                                                                                                                                                      | [19-20]       |

+: 表示有影响; -: 表示没有影响; NA: 表示未见报道。n: 表示所引用文献中样本量的总和。  
+: there is influence; -: there is no influence; NA: there is no report. n: the total sample size across the cited literatures.

**3.2.2 确定MSCs生物学效力指标** 研究供者间的差异性指标,选择合适的指标作为生物活性标志物,是解决MSCs差异性的方法之一。单细胞RNA测序结果显示,hUC-MSCs的高变异基因主要富集在细胞外区域,与MSCs的功能特性相关,参与发育、信号转导和细胞增殖<sup>[35]</sup>。不同基因表达模式的亚群,例如CD142<sup>+</sup>和CD142<sup>-</sup> hUC-MSCs,表现出不同的增殖和伤口愈合能力。这些高变异基因可作为生物学效力的潜在标志物。

CHENP等<sup>[36]</sup>利用单细胞和空间转录组测序系统分析,确定了4种脐带华通胶来源(Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs)亚群,分析了这些亚群的转录组特征、细胞异质性和细胞发育轨迹,研究中选择生物功能性MSCs(标志物为S100A9、CD29和CD142)在体外和体内均表现出良好的伤口修复性能。

此外,研究人员还开发了一系列方法,如对单细胞转录组谱数据库进行分析,通过拷贝数变异和预测双倍体/非整倍体状态潜在评估MSCs质量<sup>[37]</sup>;基于标志物分离纯化MSCs亚群,促进MSCs质量标准化,选择高质量MSCs亚型用于转化医学<sup>[8]</sup>;采用单细胞光学成像与单细胞空间脂质组学相结合的方法,来评估单细胞形态并探索与脂质代谢免疫反应的关系<sup>[38]</sup>;利用代谢组学分析和细胞因子的组合来预测MSCs的免疫抑制效力<sup>[39]</sup>等。上述方法仍有局限性,转化应用需大量研究、验证。

### 3.3 合并不同供者MSCs

为减少供者间差异,KUCI等<sup>[40]</sup>提出合并多个单一供者的MSCs,以实现治疗效果的一致性。KANNAN等<sup>[41]</sup>比较了单个供者和三个供者BM-MSCs主细胞库细胞混合后培养,合并细胞具有更稳定的特征:单个供者和合并供者细胞产量的变异系数(coefficient of variation, CV)为90% vs 60%;免疫抑制能力的CV为300% vs 32%,同时,合并后表面标志物和分化能力不变,细胞衰老特征和致瘤性特征和单个供者相似。选择具有相似特征的不同供者细胞进行合并培养,并在风湿性关节炎(rheumatic arthritis, RA)动物模型上验证疗效,结果显示,混合供者的MSCs保持了所有MSCs特征,并展现出了更强的免疫抑制能力,能降低疾病严重程度,同时,毒性研究证明混合MSCs安全性良好<sup>[42]</sup>。这与MEBARKI等<sup>[43]</sup>和ČESNIK等<sup>[44]</sup>的观点相符,建议通过筛选最佳供者

标准,混合多个供者的hUC-MSCs,以降低细胞产品的异质性。

目前,已有两种含合并供者的MSCs产品用于治疗应用<sup>[7]</sup>。第一种为印度的Stempeutics,是首家将MSCs池商业化的公司。治疗药物产品Stempeucel<sup>®</sup>由来自三名健康捐赠者的BM-MSCs组成,治疗肢体缺血、膝关节骨关节炎、肛管周围瘘管和糖尿病足等。另一种德国的“MSC-Frankfurt am Main”或MSC-FFM,是由来自八名同种异基因供者的混合骨髓单核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)组成,用于类固醇和治疗难治性急性GvHD患者。虽然合并MSCs在解决产品异质性方面确有进步,但应用仍有其局限性,包括组织相容性、免疫排斥和免疫致敏反应,因多供者合并的MSCs叠加了HLA多样性,潜在放大了免疫排斥反应。

在我国,药品监管机构发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)2023》中明确:原则上按药品开发的人源干细胞产品不建议进行合批。

### 3.4 改进生产工艺,增强MSCs优势功能

**3.4.1 通过致敏调节MSCs旁分泌** 间充质干细胞(MSCs)在临床上可以治疗多种疾病,供者间的差异给生产标准化和临床疗效的预期带来了挑战。为了解决这些问题并增强MSCs的治疗潜力,研究人员探索了许多致敏策略,包括炎症因子诱导、缺氧诱导和三维培养技术<sup>[45]</sup>。这些方法优化了MSCs分泌功能因子特性,这些功能因子针对特定疾病,具有增强的免疫调节、血管生成和再生功能。

炎症因子刺激MSCs被认为是模拟体内炎症微环境的最常用手段之一,可有效提高MSCs的免疫抑制功能。MEBARKI等<sup>[43]</sup>研究了hUC-MSCs在正常和炎症条件下的特性,发现了加入促炎症细胞因子不影响hUC-MSCs形态、增殖和表面标志物,但干扰素- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )和IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 显著诱导了2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)表达,通常该指标正常状态下不表达,其参与MSCs的免疫调节功能<sup>[46]</sup>。炎症条件下,细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)表达水平增加,参与T细胞调节<sup>[47-48]</sup>。IFN $\gamma$ 和IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 诱导的UC-MSCs能显著抑制T细胞增生,显示IFN $\gamma$ 在增强免疫调节中的关键作用,为hUC-MSCs在免疫和炎症性



疾病中的应用提供了理论支持。基于此,采用炎症因子刺激hUC-MSCs的生产工艺已获法国监管机构批准,用于治疗2型冠状病毒相关疾病。

WIESE等<sup>[49]</sup>采用三种细胞因子(TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 或IFN $\gamma$ )刺激hUC-MSCs,每种细胞因子激活后反应趋同,可解决未刺激细胞群之间的不均匀性。hUC-MSCs经TNF $\alpha$ 刺激后大部分免疫和炎症过程有关基因谱上调,IFN $\gamma$ 刺激产生明显更高水平的调节突触膜胞吐蛋白2(regulating synaptic membrane exocytosis 2, RIMS2)和CXCL12。CXCL12又称间质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1),一种淋巴细胞和MSCs的趋化分子,是hUC-MSCs治疗特定疾病的疗效相关因子。因此,将因子刺激的MSCs引发的生物标志物作为疗效的效力指标,可以区分具有不同功能特性的MSCs群体,减少差异性。

采用6种炎症因子体外和hUC-MSCs共培养后进行单细胞转录组测序发现:与IFN $\gamma$ 共培养的MSCs其免疫调节能力增强,与TNF $\alpha$ 共培养的MSCs其趋化潜力增强;与IL-4共培养的MSCs其分泌胶原的能力增强<sup>[50]</sup>。同时,也发现IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 共培养后可以降低脐带MSCs的异质性,为临床提供均一化更好的干细胞产品。

缺氧预处理是增强MSCs功能的另一种关键方法。MSCs的低氧预处理可以刺激生长因子的分泌,例如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF),这些因子对于血管生成和组织再生至关重要<sup>[51]</sup>。在缺氧条件下, MSCs激活HIF-1 $\alpha$ -GRP78-Akt信号通路,促进MSCs的存活、增殖和血管生成细胞因子分泌<sup>[52]</sup>。

3D培养技术也是一种改善异质性的方法。通过形成MSCs 3D球状体,模仿体内MSCs生态并增强其功能表型特征,球状体结构增加了细胞生长的空间,不仅保留了MSCs表型和分子特征,而且还显著增强了其免疫调节、抗纤维化、血管生成和营养特性相关的功能<sup>[53]</sup>。比较研究表明, MSCs的3D培养可以改变其转录组谱,导致免疫调节、增生、分化和血管生成过程的基因过度表达<sup>[54]</sup>。另一项研究发现,通过3D培养可致细胞内和外mRNA谱发生显著改变,从而增强免疫调节和血管生成作用<sup>[55]</sup>。

3.4.2 其他 ZHANG等<sup>[33]</sup>研究发现不同供者MSCs在细胞增殖和体内外免疫调节功能方面具有

供者依赖性变化,可能是MSCs临床疗效不一致的因素之一。IFN $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B信号转导与MSCs的免疫调节功能呈正相关,通过IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 激活这两种途径可以消除在免疫抑制功能方面的供者依赖性差异。

SHI等<sup>[56]</sup>研究发现, MSCs中CD317<sup>+</sup> MSC的百分比与其免疫抑制活性密切相关, CD317<sup>+</sup> MSC的PTX3表达水平增加,从而稳定肿瘤坏死因子诱导蛋白6(tumor necrosis factor-stimulated gene-6, TSG-6)并提高MSC治疗免疫性疾病的疗效。因此纯化CD317<sup>+</sup> MSC可降低MSCs异质性,提高MSCs疗效一致性。

此外,选择合适培养基的组成<sup>[57]</sup>,采用标准化、稳健的培养条件(如温度、传代次数等)和冻融程序<sup>[9]</sup>进行生产,从技术上最大限度地降低异质性,优化生产流程,包括冷冻保存、细胞库管理、药物使用和运输等方面,生产出更均一的细胞治疗产品<sup>[58]</sup>。研究表明标准化的生产工艺和质量控制可以降低供者导致的异质性<sup>[59]</sup>。

### 3.5 克隆MSCs(cMSCs)

与异源完整MSCs群体相比, cMSCs亚群的分离和扩增可能是提高最终治疗细胞产品一致性的解决方案。RENNERFELDT等<sup>[60]</sup>通过集落形成测定和细胞标记,可以分离cMSC群体。传统培养4天后,大多数CSF都包含多个起源细胞:35%来自单个细胞,48%来自两个细胞,其余来自3个或4个细胞,难以保证起源细胞的一致性,因此,每个孔仅有一个细胞,使用96孔板进行CSF分析和细胞标记,收集分离良好的单细胞CFUs形成的cMSC库。韩国SCM Lifescience公司已采用该技术进行骨髓来源的克隆MSCs的分离、制造并申请了专利,其产品已用于炎症性免疫疾病的临床试验<sup>[61]</sup>。

### 3.6 MSCs修饰

WRUCK等<sup>[62]</sup>分析发现, MSCs多样性主要与起源有关,微环境和表观遗传学是关键。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)衍生的MSCs(induced pluripotent stem cells derived MSCs, iMSCs)在产生时,表观遗传和染色质重塑,导致与年轻化相关的基因表达,从而克服与年龄相关的缺点(如分化和增殖能力有限)。这是一种减少年龄和组织相关引起的异质性的策略。iMSC产品已在多个国家开展临床研究,我国首个iPSC来源的间充质干细胞2022年9月8日批准进入临床试验,由中盛溯源



生物科技有限公司开发。

## 4 结语和展望

MSCs异质性可能是由于组织来源、供者和MSCs亚群之间固有的生物学差异引起的,也可能是通过制备方法引入的。可以选择合适的组织来源、供者、特定MSCs亚群和合并多个供者的MSCs、克隆MSCs等策略降低异质性,同时,改进培养条件、加强细胞的功能效力检测等方法。

关于脐带供者差异的影响,已报道的研究样本量不一且较为分散,同时,供者因素可能通过影响基因表达和信号通路,改变治疗潜力。因此,需建立严格的供者筛选标准 and 产品放行标准,选择特定MSCs亚群进行疾病模型验证,深入研究供者因素调控hUC-MSCs的分子机制,开展大规模临床试验验证其有效性和安全性。开发新技术提高hUC-MSCs质量和活性,以降低免疫原性、延长保存时间。探索hUC-MSCs与其他治疗手段的联合应用,提高治疗效果。针对不同治疗适应症,需依据hUC-MSCs的不同治疗机制,设定不同的供者筛选标准。

总而言之,人脐带间充质干细胞作为一种具有广阔应用前景的干细胞药物,其药物特性受脐带供者因素差异的影响研究具有重要的科学价值和社会意义。不断深入研究和技术创新有望为干细胞治疗和再生医学领域带来新的突破和进展。

## 参考文献 (References)

- [1] 张沁瑶, 叶鑫健, 过金晶, 等. 国内干细胞治疗环境及临床应用现状[J]. 绍兴文理学院学报(自然科学)(ZHANG Q Y, YE X J, GUO J J, et al. Stem cell therapy environment and clinical application in China [J]. Journal of Shaoxing College of Arts and Sciences), 2021, 41(8): 115-9.
- [2] CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 1991, 9: 641-50.
- [3] NOMBELA-ARRIETA C, RITZ J, SILBERSTEIN L E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12( 2): 126-31.
- [4] 王玲利. 人脐带间充质干细胞的研究进展及应用[J]. 中国科技博览(WANG L L. Research progress and application of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. China science and Technology Review), 2018(2): 324-5.
- [5] 余珊珊, 魏开坤. 从审评角度探讨间充质干细胞产品的质量控策略和案例分析[J]. 中国新药杂志(YU S S, WEI K K. Discussion on quality control strategy and case study of mesenchymal stem cells products from regulatory perspective [J]. Chinese Journal of New Drugs), 2019, 28(16): 1975-7.
- [6] MAGED G, ABDLSAMED M, WANG H, et al. The potency of mesenchymal stem/stromal cells: does donor sex matter [J]? Stem Cell Res Ther, 2024, 15(112): 1-10.
- [7] ČESNIK A B, ŠVAJGER U. The issue of heterogeneity of MSC-based advanced therapy medicinal products: a review [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, doi: 10.3389/fcell.2024.1400347.
- [8] CHEN S, LIANG B, XU J. Unveiling heterogeneity in MSCs: exploring marker-based strategies for defining MSC subpopulations [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 459.
- [9] MORENO L, AGUILERA Y, SANCHEZ C, et al. Heterogeneity of *in vitro* expanded mesenchymal stromal cells and strategies to improve their therapeutic actions [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(5): 1-23.
- [10] HUANG S, FENG C, WU Y, et al. Dissimilar characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells from donors of different ages [J]. Cell Tissue Bank, 2013, 14(4): 707-13.
- [11] ALREFAEI G, AYUOB N, ALI S, et al. Effects of maternal age on the expression of mesenchymal stem cell markers in the components of human umbilical cord [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2015, 53(3): 259-71.
- [12] GIL-KULIK P, ŚWISTOWSKA M, KINDRACKA A, et al. Increased expression of BIRC2, BIRC3, and BIRC5 from the IAP family in mesenchymal stem cells of the umbilical cord Wharton's jelly (WJSC) in younger women giving birth naturally [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, doi: 10.1155/2020/9084730.
- [13] GIL-KULIK P, ŚWISTOWSKA M, KRZYZANOWSKI A, et al. Evaluation of the impact of pregnancy-associated factors on the quality of Wharton's jelly-derived stem cells using SOX2 gene expression as a marker [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 1-13.
- [14] BADRAIQ H, CVORO A, GALLEU A, et al. Effects of maternal obesity on Wharton's jelly mesenchymal stromal cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1-13.
- [15] PENOLAZZI L, VECCHIATINI R, BIGNARDI S, et al. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009, doi: 10.1186/1477-7827-7-106.
- [16] AVERCRNC-LEGER L, GUERCI P, VIRION J, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 161,1-13.
- [17] HONG, S H, MAGHEN L, KENIGSBCEG S, et al. Ontogeny of human umbilical cord perivascular cells: molecular and fate potential changes during gestation [J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(17): 2425-39.
- [18] MONTMURRO T, ANDRIOLO G, MONTELATICI E, et al. Differentiation and migration properties of human foetal umbilical cord perivascular cells: potential for lung repair [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(4): 796-808.
- [19] KARACA C, BOSTANCIERI N, OVAYOLU A, et al. The effect of vascular complications of diabetes mellitus on human umbilical cord tissue and the number of Wharton jelly's mesenchymal stem cells [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(12): 9313-23.
- [20] MONTANUCCI P, PESCARA T, PENNONI I, et al. Functional profiles of human umbilical cord-derived adult mesenchymal stem cells in obese/diabetic versus healthy women [J]. Curr Diabetes Rev, 2018, 14: 24-35.
- [21] ADACHI K, SUEMORI H, YASUDA S Y, et al. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells [J].

- Genes Cells, 2010, 15(5): 455-70.
- [22] LIU P F, CAI J L, DONG D L, et al. Effects of SOX2 on proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells [J]. PLoS One, 2015, 10(10): 1-17.
- [23] RUSSELL J P, LIM X H, SANTAMBROGI A, et al. Pituitary stem cells produce paracrine WNT signals to control the expansion of their descendant progenitor cells [J]. eLife, 2021, doi: 10.7554/eLife.59142.
- [24] REZNICZEK G A, KUMBRUCH S, SCHEICH J, et al. Factors influencing yield and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and matrix [J]. Regen Med, 2016, 11(5): 465-74.
- [25] BALZANO F, EMANUELA BELLU E, BASOLI V, et al. Lessons from human umbilical cord: gender differences in stem cells from Wharton's jelly [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 234: 143-8.
- [26] BALZANO F, CAMPESI I, CRUCIANI S, et al. Epigenetics, stem cells, and autophagy: exploring a path involving miRNA [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1-11.
- [27] KUMA A, HATANO M, MATSUI M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. Nature, 2004, 432(7020): 1032-6.
- [28] ZHANG Y, LÜ P, LI Y, et al. Comparison of the biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells derived from the human heterosexual twins [J]. Differentiation, 2020, 114: 1-12.
- [29] 王荣. 不同供者来源脐带间充质干细胞生物学特性差异的初步研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [30] 冯莉. 不同供者脐带间充质干细胞生物学特性的比较研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [31] XIE Y Y, LIU S, WANG L D, et al. Individual heterogeneity screened umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells with high Treg promotion demonstrate improved recovery of mouse liver fibrosis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 1-17.
- [32] BAI X L, CHEN T W, LI Y Q, et al. PD-L1 expression levels in mesenchymal stromal cells predict their therapeutic values for autoimmune hepatitis [J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 1-16.
- [33] ZHANG C X, ZHOU L Q, WANG Z, et al. Eradication of specific donor-dependent variations of mesenchymal stem cells in immunomodulation to enhance therapeutic values [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 1-11.
- [34] ZHU X, WANG Z, SUN Y E, et al. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells from different donors on spinal cord injury in mice [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 15: 1-17.
- [35] SUN C B, WANG L, WANG H L, et al. Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells cultured *in vitro* [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 1-16.
- [36] CHEN P, TANG S, LI M, et al. Single-cell and spatial transcriptomics decodes Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells heterogeneity and a subpopulation with wound repair signatures [J]. Adv Sci, 2023, 10(4): 1-21.
- [37] YU M, SUI K, WANG Z, et al. MSCsDB: a database of single-cell transcriptomic profiles and in-depth comprehensive analyses of human mesenchymal stem cells [J]. Exp Hematol Oncol, 2024, 13(29): 1-5.
- [38] PRIYADARSHANII P, GROUW A V, LIVERSAGE A R, et al. Investigation of MSC potency metrics via integration of imaging modalities with lipidomic characterization [J]. Cell Rep, 2024, 43(8): 1-17.
- [39] MAUGHON T S, SHEN X, HUAN D, et al. Metabolomics and cytokine profiling of mesenchymal stromal cells identify markers predictive of T-cell suppression [J]. Cytotherapy, 2022, 24(2): 137-48.
- [40] KUCI Z, BONIG H, KREYENBERG H, et al. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey [J]. Haematologica, 2016, 101(8): 985-94.
- [41] KANNAN S, KRISHNA S G, GUPTA P K, et al. Advantages of pooling of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from different donors versus single-donor MSCs [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 1-13.
- [42] KANNAN S, VISWANATHAN P, GUPTA P K, et al. Characteristics of pooled Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs) and their potential role in rheumatoid arthritis treatment [J]. Stem Cell Res Rep, 2022, 18(5): 1851-64.
- [43] MEBARKI M, IGLICHI N, MARIGNY C, et al. Development of a human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-based advanced therapy medicinal product to treat immune and/or inflammatory diseases [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 1-15.
- [44] ČESNIK A B, ŠVAHGER U, et al. The issue of heterogeneity of MSC-based advanced therapy medicinal products: a review [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1-20.
- [45] WORLD J. Use of priming strategies to advance the clinical application of mesenchymal stromal/stem cell-based therapy [J]. Stem Cells, 2024, 16(1): 7-18.
- [46] REN G, SU J, ZHANG L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell mediated immunosuppression [J]. Stem Cells, 2009, 27(8): 1954-62.
- [47] REN G W, ZHAO X, ZHANG L Y, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression [J]. J Immunol, 2010, 184(5): 2321-8.
- [48] GUAN Q, LI Y, SHPIRUK T, et al. Inducible indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and programmed death ligand 1 expression as the potency marker for mesenchymal stromal cells [J]. Cytotherapy, 2018, 20(5): 639-49.
- [49] WIESE D M, WOOD C A, FORD B N, et al. Cytokine activation reveals tissue imprinted gene profiles of mesenchymal stromal cells [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1-15.
- [50] HU Z, LI D D, WU S D, et al. Unveiling the functional heterogeneity of cytokine-primed human umbilical cord mesenchymal stem cells through single-cell RNA sequencing [J]. Cell Biosci, 2024, 14(40): 1-18.
- [51] ZHILA Z, BILING M, SUJUN Q, et al. Preconditioning in lower oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury [J]. Brain Res, 2016, 1642: 426-35.
- [52] LEE J H, YOON Y M, LEE S H. Hypoxic preconditioning promotes the bioactivities of mesenchymal stem cells via the HIF-1 $\alpha$ -GRP78-Akt axis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1-14.
- [53] KOUROUPIS D, CORREA D. Increased mesenchy-

- mal stem cell functionalization in three-dimensional manufacturing settings for enhanced therapeutic applications [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.621748.
- [54] GALLO A, CUSCINO N, CONTINO F, et al. Changes in the transcriptome profiles of human amnion-derived mesenchymal stromal/stem cells induced by three-dimensional culture: a potential priming strategy to improve their properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 1-15.
- [55] BULATI M, GALLO A, ZITO G, et al. 3D culture and interferon- $\gamma$  priming modulates characteristics of mesenchymal stromal/stem cells by modifying the expression of both intracellular and exosomal microRNAs [J]. *Biology*, 2023, 12(8): 1-18.
- [56] SHI S, CHEN S, LIANG B, et al. Improved therapeutic consistency and efficacy of CD317<sup>+</sup> MSCs through stabilizing TSG6 by PTX3 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(92): 1-15.
- [57] FITZGERALD J C, SHAW G, MURPHY M, et al. Media matters: culture medium-dependent hypervariable phenotype of mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 1-18.
- [58] SANTOS M E F, ARRANZ M G, ANDREU E J, et al. Optimization of mesenchymal stromal cell (MSC) manufacturing processes for a better therapeutic outcome [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1-19.
- [59] REBELATTO C L K, LEITE L M B, DAGA D R, et al. Quality control optimization for minimizing security risks associated with mesenchymal stromal cell-based product development [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 1-24.
- [60] RENNERFELDT D A, RAMINHOS J S, LEFF S M, et al. Emergent heterogeneity in putative mesenchymal stem cell colonies: Single-cell time lapsed analysis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): 1-33.
- [61] DUNN C M, KAMEISHI S, GRAINGER D W, et al. Strategies to address mesenchymal stem/stromal cell heterogeneity in immunomodulatory profiles to improve cell-based therapies [J]. *Acta Biomater*, 2021, 133: 114-25.
- [62] WRUCK W, GRAFFIMANN N, SPITZHORN L S, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire rejuvenation and reduced heterogeneity [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.717772.