

人多能干细胞来源的间充质细胞的工艺开发与质量评价研究进展

梁钻姬¹ 庞培卓² 王小方¹ 瞿少刚³ 门增轩¹ 徐仁和^{2*}

(¹珠海横琴爱姆斯坦生物科技有限公司研发部, 珠海 519000; ²澳门大学医学院, 澳门 999078;

³南方医科大学南方医院神经内科, 广州 510515)

摘要 间充质干/基质细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)存在于体内几乎所有组织器官中。MSCs可从多种成体组织提取后在体外扩增, 通过旁分泌和外泌体等机制而非其干性来调节免疫和促进再生。MSCs作为细胞治疗产品, 已在动物实验和临床试验中进行了广泛评估, 并被试用于治疗多种自身免疫性疾病、炎症性疾病、退行性疾病以及组织损伤, 故又被提议改名为药用信号细胞(medicinal signaling cells)。最近国家药品监督管理局药品审评中心提议称其为“间充质细胞”。MSCs还可由具备无限自我更新和多向分化潜能的多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)定向分化获得, 从而实现可持续供应。iPSCs由成体细胞通过表观重编程获得, 可产生自体同源MSCs。相比之下, ESCs具有天然的多能性, 不需要基因操作和表观遗传修饰, 也不存在重编程细胞可能残留的成体细胞表观遗传记忆。该文基于现有文献, 全面介绍PSCs向MSCs分化的工艺路径和所得MSCs的质量评价体系, 重点阐述ESCs来源的MSCs(ESC-MSCs)的研究进展, 同时兼顾iPSCs来源的MSCs(iPSC-MSCs)的特征, 旨在为PSCs来源MSCs的标准化研发与临床转化提供参考依据。

关键词 多能干细胞; 胚胎干细胞; 间充质干细胞; 间充质基质细胞; 工艺; 质量

Progress in Process Development and Quality Assessment of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells

LIANG Zuanji¹, PANG Peizhuo², WANG Xiaofang¹, QU Shaogang³, MEN Zengxuan¹, XU Ren-He^{2*}

(¹Research and Development Department, Zhuhai Hengqin ImStem Biotechnology Co., Ltd, Zhuhai 519000, China;

²Faculty of Medicine, University of Macau, Macao 999078, China; ³Department of Neurology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract MSCs (mesenchymal stem/stromal cells) are present in nearly all tissues and organs of the body. They can be isolated from diverse somatic sources, expanded *in vitro*, and function primarily by modulating immunity and promoting regeneration through paracrine signaling and small extracellular vesicles, rather than by their stemness. As a form of cell-based therapy, MSCs have been extensively investigated in animal studies and clinical trials for the

收稿日期: 2026-02-01

接受日期: 2026-08-22

科技部国家重点研发计划(批准号: 2022YFA1105000)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 32270842)、澳门科学技术发展基金(FDCT)(批准号: 0002-2021-AKP、0071-2022-A2、0106/2024/RIA2)和澳门大学科研基金(批准号: CPG2024-00037-FHS、MYRG2022-GRG00044-FHS、MYRG2024-GRG00193-FHS)资助的课题

*通信作者。Tel: 00853-88222919, E-mail: renhexu@um.edu.mo

Received: February 1, 2026

Accepted: August 22, 2026

This work was supported by the National Key R&D Program of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2022YFA1105000), the General Grant of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32270842), the Macau Science and Technology Development Fund (FDCT) Grants (Grant No.0002-2021-AKP, 0071-2022-A2, 0106/2024/RIA2) and the University of Macau Grants (Grant No.CPG2024-00037-FHS, MYRG2022-GRG00044-FHS, MYRG2024-GRG00193-FHS)

*Corresponding author. Tel: +853-88222919, E-mail: renhexu@um.edu.mo

treatment of a wide range of autoimmune, inflammatory, degenerative diseases, as well as tissue injuries. MSCs have been proposed to be redefined as “medicinal signaling cells”, reflecting their primary mechanism of action through paracrine signaling and immunomodulation. Notably, the Center of Drug Evaluation, NMPA (National Medical Products Administration) has recently proposed adopting the simplified nomenclature “mesenchymal cells”. MSCs can also be continuously derived from PSCs (pluripotent stem cells), which possess unlimited proliferative and differentiation capacities, such as human ESCs (embryonic stem cells) and iPSCs (induced pluripotent stem cells). iPSCs, generated through the epigenetic reprogramming of somatic cells, enable the production of autologous MSCs. In contrast, ESCs exhibit bona fide pluripotency and are free from the need for genetic manipulation or induced reprogramming, thereby avoiding the residual somatic epigenetic memory possibly present in reprogrammed cells. Based on existing literatures, this article provides a comprehensive overview of the differentiation pathways from PSCs to MSCs and the quality evaluation system for the derived MSCs. It focuses on elucidating the research progress of ESC-MSCs (ESC-derived MSCs), while also covering the characteristics of iPSC-MSCs (iPSC-derived MSCs). The objective is to provide guidance for the standardized development and clinical translation of PSC-derived MSCs.

Keywords pluripotent stem cells; embryonic stem cells; mesenchymal stem cells; mesenchymal stromal cells; process; quality

近年来, 细胞治疗产品尤其是间充质干/基质细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)研究发展迅速。MSCs因其免疫调节和促进再生的双重作用被用于自身免疫、炎性和退行性疾病以及组织和器官损伤的治疗, 在动物和临床研究中显示出广泛疗效^[1]。MSCs呈成纤维细胞样, 分布于几乎所有组织和器官的间质, 而且具有自我更新能力和多向分化能力(尤其在离体培养后)。它们可以来源于多种富含MSCs的人类成体组织(somatic tissue, ST), 例如骨髓(bone marrow, BM)、脂肪(adipose, AD)、脐带(umbilical cord, UC)、羊膜(amnion membrane, AM)和牙髓(dental pulp, DP)等, 也可以通过人类多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)分化而来(PSC-MSCs), 如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)分化的MSCs(ESC-MSCs)和人类诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)分化的MSCs(iPSC-MSCs)^[2-3]。

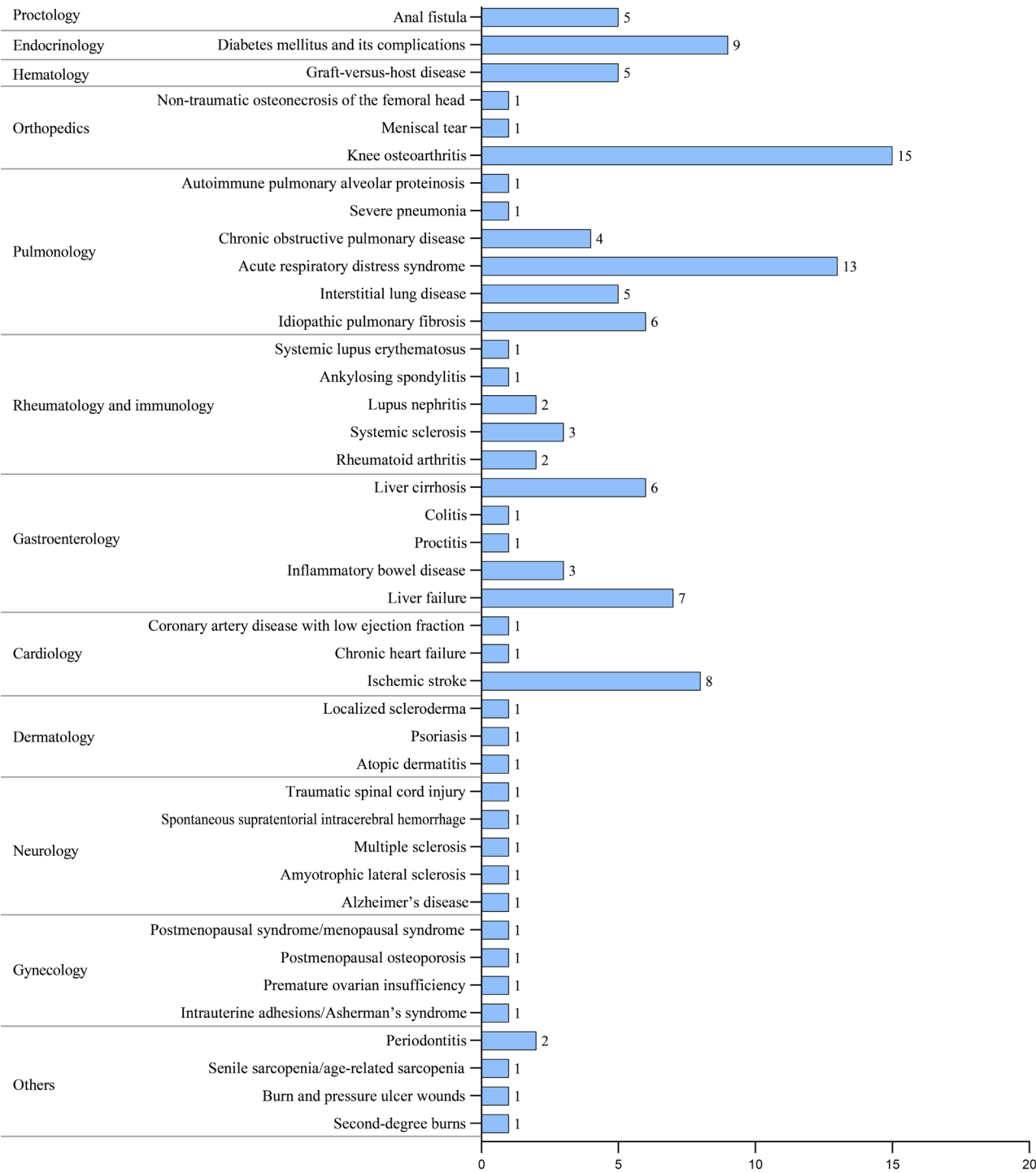
据全球临床试验注册与查询平台 ClinicalTrials 官网(<https://clinicaltrials.gov/>)统计, 全球共有1 600多个MSCs药物正在开展干预性临床试验, 其中已有13款MSCs药物获上市批准(表1, 检索截至2026年1月)。在中国, 首款MSCs药物也于2025年1月2日正式获批上市, 另有60余款MSCs被国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准为研究性新药(investigational new drug, IND), 120多个项目进入临床试验阶段, 所覆盖的疾病超

过40种(图1, 检索截至2026年1月)。从疾病分布来看, 膝关节关节炎(knee osteoarthritis, KOA)、急性呼吸窘迫综合征和糖尿病及其并发症是前三大治疗方向。值得注意的是, 已获得IND批准的临床试验包括1项使用iPSC-MSCs治疗KOA的项目, 以及5项使用ESC-MSCs分别治疗急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)、急性呼吸窘迫综合征、间质性肺病急性加重、半月板损伤和多发性硬化症的项目。

目前大多数处在临床试验阶段的MSCs制剂属于ST-MSCs, 仅有个别是PSC-MSCs。然而, 供体组织来源、质量和培养方法的差异导致所报道的ST-MSCs的体内疗效呈现一定差异^[18], 采用PSC-MSCs或可为克服上述挑战提供一种潜在策略。ESCs来源于人类胚胎发育至第5至7天时形成的囊胚(blastocyst), 由其内细胞群分离后在体外扩增而来^[19]。ESCs能保持原始的未分化特性, 具有自我更新和在体外无限增殖的潜能, 并可分化成各胚层下游的成体细胞, 包括MSCs; 相比之下, 从不同供体组织获取的ST-MSCs来源有限, 质量参差不齐, 还需要对每个供体进行病原体筛查^[20], 这些因素为其临床应用带来挑战。iPSCs由成体细胞通过表观重编程而来, 理论上具备ESCs的所有特性, 其分化的细胞(包括MSCs), 如果用于提供成体细胞的患者, 就不会发生因组织相容性抗原不同而被免疫排斥^[21-22]。ESCs拥有天然的多能性, 而iPSCs由成体细胞通过重编程获

表1 全球获批上市的MSC药物
Table 1 MSC drugs approved for sale worldwide

序号	商品名/通用名	细胞来源	适应症	批准地	制造商	批准/许可时间	当前状态	参考文献
Number	Trade name/ nonproprietary names	Cell source	Indication	Country/region of approval	Manufac- turer	Date of approval	Current status	Refer- ence
1	Queen-cell®	Autologous adipose tissue	Subcutaneous soft tissue/con- nective tissue defects	Republic of Korea	Anterogen Co., Ltd.	2010	Marketed	[4]
2	Cellgram- AMI®	Autologous bone marrow	Myocardial improvement after acute myocardial infarction	Republic of Korea	Pharmicell Co., Ltd.	2011	Marketed	[5]
3	Cartistem®	Alloge- neic umbilical cord blood	Degenerative knee cartilage defects	Republic of Korea	Medipost Co., Ltd.	2012	Marketed	[6]
4	Cupistem®	Autologous adipose tissue	Crohn's disease with complex perianal fistulas	Republic of Korea	Anterogen Co., Ltd.	2012	Marketed	[7]
5	Prochymal® (remestemcel- L)	Allogeneic bone marrow	Pediatric acute graft-versus-host disease	Canada	Osiris Thera- peautics Mesoblast	2012	Marketed	[8]
6	NeuroNata-R®	Autologous bone marrow	Amyotrophic lateral sclerosis	Republic of Korea	Corestem Inc.	2014	Marketed	[9]
7	TEMCELL® HS Injection	Allogeneic bone marrow	Acute graft-versus-host disease	Japan	JCR Pharma- ceutics Co., Ltd.	2015	Marketed	[10]
8	Stempeucel®	Allogeneic bone marrow	Severe limb ischemia caused by thromboangiitis obliterans	India	Stempeutics Research Pvt. Ltd.	2017	Conditional mar- keting authoriza- tion	[11]
9	Stemirac®	Autologous bone marrow	Neurological dysfunction caused by traumatic spinal cord injury	Japan	Nipro Cor- poration	2018	Conditional marketing autho- rization (time- limited)	[12]
10	Alofisel® (dar- vadstrocel)	Allogeneic adipose tissue	Crohn's disease with complex perianal fistulas	European Union	TiGenix N.V.	2018	Marketing authorization withdrawn on December 13, 2024	[13]
				Japan	Takeda Phar- maceutical Co., Ltd.	2021	Conditionally approved	[14]
11	AKUUGO® Suspension for Intracra- nial Implantation (vandefitemcel, SB623)	Allogeneic bone marrow	Chronic motor paralysis caused by traumatic brain injury	Japan	SanBio Co., Ltd.	2024	Conditional marketing autho- rization (time- limited)	[15]
12	Ryoncil® (remestemcel- L-rknd)	Allogeneic bone marrow	SR-aGVHD (steroid-refractory acute graft-versus-host disease) in pediatric patients aged 2 months and older	United States	Mesoblast, Inc.	2024	Marketed	[16]
13	Ruobosheng® (Amimestrocel Injection)	Alloge- neic umbilical cord tissue	Acute graft-versus-host disease with predominant gastrointes- tinal involvement, refractory to hormone therapy, in patients aged 14 and older	China	Bosheng Excellent Biotechnol- ogy (Beijing) Co., Ltd.	2025	Conditionally approved	[17]



The number of MSC projects approved for IND (investigational new drug) clinical trials by listed disease indication

图1 获批作为研究性新药进入临床试验的MSC项目
Fig.1 MSC projects approved as INDs to enter clinical trials

得多能性,因而可能残留来自成体细胞的表现遗传记忆及累积性突变。据此推测,与iPSC-MSCs比较,ESC-MSCs在治疗应用中可能具有更高的安全性与有效性。然而,这一推测尚需实验来验证^[2-3]。

目前,针对PSC-MSCs临床前和临床研究的综

述尚不多,本文期望弥补这方面的欠缺。基于ESC-MSCs的分化方法和治疗应用多于iPSC-MSCs,本文重点聚焦于ESC-MSCs的研发现状。通过PubMed和CNKI数据库以及NMPA等官方网站进行搜索、文档分析和综述,介绍MSCs的起源、历史与定义演

变。另外,由于目前MSCs的质量评价体系多基于ST-MSCs,本文将侧重介绍ESCs向MSCs经不同路径的分化工艺和所得MSCs的质量评价体系,为PSCs及其衍生细胞的研究与临床转化提供参考依据。

MSCs的起源可以追溯到1974年。当时,俄罗斯Friedenstein等^[23]科学家发现从小鼠骨髓中提取出的一种成纤维细胞样细胞可分化成骨细胞。随后,在1991年,美国凯斯西储大学(Case Western Reserve University)的Caplan团队^[24]首次从成人骨髓中分离出这些细胞,并将其正式命名为“间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)”。

随着研究深入,对于MSCs定义和特性的争议日益凸显^[25],并导致了一些混乱,使得不同实验室之间难以比较和重复研究结果,具体体现如下。(1) 起源和定义上的混淆:不同的实验室对于MSCs的来源和定义存在不一致的看法。一些研究将多种细胞群体如内皮细胞和周细胞归类为MSCs,但这些细胞在分子特性和分化能力上存在显著差异^[26]。(2) 分化潜力的争议:一些研究声称MSCs具有较广泛的多能性,能够分化成多种组织的细胞,而其他研究则认为它们只能分化成与来源组织相关的细胞类型^[26-27]。(3) 生物学功能的不确定性:一些研究提出MSCs通过分泌信号分子参与组织修复和免疫调节,但具体机制和作用范围因条件而异,尚未完全查清^[28]。(4) 临床应用的不确定性:关于MSCs的疗效和机制的争议导致了临床应用及疗效评估的不确定性,医生难以做出基于证据的判断^[20]。基于上述问题,一些科学家和科学团体建议修改MSCs的含义。MSCs术语的原始提出者Caplan^[29]提议使用“药用信号细胞(medicinal signaling cells)”来更准确地反映这些细胞能富集于损伤或疾病部位,分泌调节免疫和促进再生的生物活性因子,并能用于细胞移植治疗的事实。现有大量研究都使用“MSCs”缩写。但实际上,根据研究内容和发现以及作者需要或偏好,MSCs可能代表不同术语,包括间充质基质细胞(mesenchymal stromal cells)、间充质干细胞和药物信号细胞等。

国际细胞治疗学会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)于2006年首次提出MSCs的鉴定标准,并建议保留MSCs缩写,这是基于该缩写对于维持科学研究和记录的连贯性至关重要,但因为不同组织的MSCs表现出不同的表型和功能,ISCT建议使用功能定义来确定“MSCs”的含义^[30]。例如,

“间充质干细胞”与“间充质基质细胞”是不同的术语,前者特指具有自我更新和多向分化潜能的干细胞群体,而后者指的是具有分泌、免疫调节和归巢等特性的细胞群体^[30]。然而,自ISCT首次提出MSCs的鉴定标准以来,学界仍未找到有效方法区分“间充质基质细胞”和“间充质干细胞”,致使在临床实践中常将“间充质基质细胞”当作“间充质干细胞”使用,反之亦然。这种概念的混淆,也部分导致了MSCs临床效果的不稳定性,在一定程度上影响了细胞治疗行业的发展。

为了解决长期以来MSCs研究和应用中的细胞性质争议与标准化难题,ISCT于2025年组织全球领域专家,运用德尔菲法,经过三轮意见征询、反馈和投票,对MSCs的每一项鉴定指标均进行了筛选和确认,最终制定出了最新版本的MSCs共识标准,从细胞定义、鉴定指标和功能评价等多个维度进行了系统性重构。此共识确认了MSCs的标准术语为“间充质基质细胞”,并排除了“间充质基质细胞”与“间充质干细胞”可互换使用的表述。若使用“间充质干细胞”这一表述,必须提供实验证据证明细胞的“干性”(如自我更新和多向分化能力)^[31]。最近,国家药品监督管理局药品审评中心将其称为“间充质细胞”,旨在采用中性统称以规避命名分歧,从审评端出发聚焦此类活细胞药的质量控制和临床价值^[32]。我们认同这一表述所体现的规范化导向。考虑到行文一致性以及国际文献惯例,本文后续仍继续使用缩写“MSCs”。

1 PSCs向MSCs分化的工艺路径

自1998年Thomson团队^[19]首次建立ESCs和2006年Yamanaka团队^[22]首次报道iPSCs以来,科学家们已开发出多种使PSCs向MSCs定向分化的技术,主要包括早期的诱导细胞共培养法、细胞群挑选法、类胚体分化法和基于不同胚层或发育阶段的定向分化法,以及在三维(three-dimension, 3D)条件下使ESCs向MSCs分化的悬浮动态培养工艺。

1.1 与诱导细胞共培养法

2005年,研究者首次通过将ESCs与小鼠骨髓来源的OP9基质细胞共培养,成功诱导获得ESCs来源的多能间充质前体细胞。经过40 d共培养后,分选得到CD73⁺细胞,将其置于添加有胎牛血清的 α -MEM(alpha-minimum essential medium)培养基中扩增培养1~2周,所获的细胞呈典型成纤维样形态,

符合MSCs免疫表型特征,具备成骨、成软骨和成脂三系分化潜能^[33]。

1.2 细胞群挑选法

Olivier等^[34]于2011年提出了一种不依赖饲养层的分化方案。该方法从ESC培养体系中人工挑取自然分化的细胞群(被称为Raclures),将其置于血清培养基中进行为期4周的进一步分化,随后分离出纺锤形的成纤维细胞样细胞,并确认为MSCs^[34]。然而,由于人工挑选的主观性强而客观筛选标准不足,该方法的分化效率较低。为此,学术界转而探索通过精确调控培养环境与信号通路,以实现高效、特异的MSCs定向诱导。

1.3 类胚体分化法

类胚体(embryoid bodies, EBs)是由PSCs在体外聚集形成的三维球状结构,是模拟早期胚胎发育和细胞分化的重要模型。Brown等^[35]报道了从ESC经EBs分化成MSCs的方法,由于EBs内部细胞存在不同分化倾向和异质性,因此需要对表达MSCs标记物(如CD73和CD105)的细胞进行筛选,并多次传代以获得形态和表型均一的MSCs。为提高诱导效率,Kimbrel等^[36]将ESC形成的EBs先分化为成血管细胞(hemangioblast),然后在MSCs培养基中进一步分化为MSCs。此外,Wu等^[37]将ESC接种于玻连蛋白包被板(vitronectin-coated plates),在E8(Essential 8)培养基中培养,随后将ESC解离为小细胞团,悬浮培养5 d以形成EBs;再将EBs转移至同类型包被板上培养14 d,最后取EBs中长出的细胞在一种专用培养基中传代5次,即形成MSC样细胞,被命名为免疫与基质调控细胞(immunity- and matrix-regulatory cells, IMRCs)。

1.4 经中胚层分化法

中胚层(mesoderm)是三胚层之一,与外胚层(ectoderm)和内胚层(endoderm)共同构成早期胚胎。特定的生长因子、信号分子和小分子抑制剂如SB431542通过阻断维持多能性的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号转导改变PSCs命运,使其逐级分化成MSCs^[38-39]。2010年,Vodyanik等^[40]将ESC与作为中胚层诱导物的OP9细胞共培养,然后分离去除悬浮的OP9细胞,使用成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)处理贴壁细胞,最后获得含有间充质前体细胞的集落,该前体细胞可进一步分化为MSCs。他们第一次在单细胞水平上跟踪了

由ESC向MSCs的定向分化过程。

1.5 神经嵴细胞分化法

神经嵴细胞(neural crest cells, NCCs)是脊椎动物特有的多能祖细胞,具有分化成软骨细胞、外周神经元和黑色素细胞等多种细胞的能力。NCCs的形成、迁移和分化受到严格的调控,其发育异常会导致胚胎发育畸形^[41]。含有GSK3 β 抑制剂、TGF- β 抑制剂和极少量胰岛素的化学成分确定培养基(chemically defined medium, CDM)可使PSCs分化成NCCs; NCCs在含EGF和FGF2的CDM中可稳定扩增逾10代,而在含有GSK3 β 抑制剂、TGF- β 抑制剂和极少量胰岛素的特异CDM中可进一步分化成MSCs^[42]。

1.6 经神经中胚层分化法

在鸡、小鼠和人类的胚胎发育过程中,存在一类特殊的细胞群体,称为神经中胚层祖细胞(neuromesodermal progenitors, NMPs)。这些细胞定位于原条区域的尾侧外胚层(caudal lateral epiblast, CLE)和相邻的结节-条纹边缘(node-streak border, NSB),共表达SRY盒转录因子2(SRY-box transcription factor 2, SOX2)和Brachyury蛋白。NMPs特征性表达同源域转录因子HOX蛋白家族(HOX1~13),具有双向分化潜能,既能生成尾侧脊髓等后部神经组织,也能分化为旁轴中胚层来源的组织,包括椎骨、软骨和肌肉。Wang等^[43]于2019年报道,他们使用Wnt激动剂CHIR99021,联合bFGF和TGF- β 1诱导人PSCs向NMPs分化,该组合可抑制SOX2表达,避免细胞定向分化成神经细胞;4~5 d后,细胞进入迅速增殖期,大多数细胞表达了副轴中胚层标记物T和TBX6(T-box transcription factor 6),即类似于旁轴中胚层细胞。随后,他们将培养基改为无动物源、无血清的MesenCult™-ACF Plus培养基。继续培养2~3周后,细胞形态发生显著变化,出现增殖活跃的成纤维细胞样细胞,其经鉴定确认为MSCs(亦即NMP-MSCs)。相较于BM-MSCs, NMP-MSCs在体内外模型中均表现出更强的免疫调节活性^[43]。

1.7 经滋养层细胞分化法

滋养层是构成胎盘屏障的上皮细胞层。在囊胚期,细胞命运发生第一次改变,形成滋养外胚层和内细胞团;后者进一步分化为上胚层和原始内胚层。受精后第7天囊胚嵌入子宫,滋养外胚层发育成细胞滋养层,该细胞滋养层可进一步分化为合体滋养层和绒毛/绒毛外滋养层^[44]。绒毛间充质是

胎盘 MSCs 的主要来源之一^[45], 本研究团队前期研究显示, 骨形成蛋白 4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)可诱导人 ESCs 直接分化为以滋养层细胞为主的胚外细胞^[46-47]。这些细胞在含胎牛血清培养基中可进一步分化为 MSCs(命名为 T-MSCs)。T-MSCs 表达典型的 MSCs 标记, 并具备三系分化潜能和免疫调节功能^[48]。与 BM-MSCs 相比, T-MSCs 分泌更低水平的促炎因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、C-X-C 基序趋化因子配体 10(C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL10; 又称 IP-10)以及 C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2, CCL2; 又称 MCP-1), 且在 IFN- γ 刺激下表达较高水平的免疫抑制因子程序性死亡配体 1(programmed death-ligand 1, PD-L1; 又称 CD274), 在小鼠溃疡性结肠炎和多发性硬化症等自身免疫性和炎症性疾病等动物模型中均显示出良好的治疗效果^[48]。T-MSCs 亦可在一个无动物血清且化学成分完全确定的培养体系中获得^[47]。2020 和 2025 年, T-MSCs 作为研究性新药(IND)分别通过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和中国 NMPA 批准, 用于多发性硬化症的临床试验。

1.8 三维(3D)条件下悬浮动态形成 ESC-MSCs 微球

上述方法(除经 EBs 形成 MSCs 外)均局限于二维(two-dimension, 2D)静态贴壁体系。Otsuji 等^[49]于 2014 年首先报道了 3D 微球悬浮动态培养 ESCs 的方法。该研究通过使用机械传代和功能性聚合物使 ESCs 在悬浮状态下作为球体扩增, 克服了悬浮搅拌培养中常见的细胞团自发融合及传代损伤等难题, 并能在超过 60 代的连续传代中稳定维持 ESCs 的多能性^[49]。该体系操作便捷, 成本优势显著, 适用于临床级 ESCs 的规模化制备。

基于此, 本团队于 2018 年建立了 3D 悬浮条件下在 20 d 内直接完成人 ESCs 微球直接分化成 ESC-MSCs 微球的定向分化方法^[50]。相较于 2D 培养体系, 3D 培养策略在不增加传代操作的前提下, 使单位反应器产量提升 67%, 培养基消耗量降低 50%, 且培养周期缩短近一半, 显著降低了规模化制备的成本; 所获 ESC-MSCs 微球不仅保有典型 MSCs 表型, 还表现出更强的增殖能力及抗炎活性^[50]。在体研究显示, ESC-MSCs 微球可有效促进急性慢性创面愈合^[51-54]、缓解非人灵长类多发性硬化症症状^[55], 并支持骨缺损修复^[50]; 其在小鼠 aGVHD 模型中通过分泌前列腺

素 E2(prostaglandin E2, PGE2)及诱导调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)扩增发挥免疫调节效能, 作用机制与 BM-MSCs 相似但工艺优势显著^[56]。

值得指出的是, 3D 培养所带来的 MSCs 微球功能增强效应并非 T-MSCs 微球所独有。越来越多研究表明, 不同来源 MSCs 成球后均可表现出更强的旁分泌活性、抗炎能力和组织修复功能。例如, Bhang 等^[57]证实脐带血来源的 MSCs 微球在小鼠肢体缺血模型中显著优于单细胞悬液; Amos 等^[58]报道 AD-MSCs 微球通过上调细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关成分表达和促进生长因子分泌, 加速了糖尿病溃疡的愈合进程。Kouroupis 等^[59]在系统综述中进一步指出, 3D 培养不仅可增强 MSCs 治疗效力, 亦能提升其工业化生产潜力, 提示 3D 制造平台有望成为未来 MSCs 产品开发的重要方法。然而, 该技术仍需在不同细胞系间的工艺稳健性、批间稳定性、长期安全性和临床疗效验证等方面开展更深入的研究, 以推动其临床转化。

微球体系在物流运输方面也具有显著优势。研究表明, ST-MSCs 与 PSC-MSCs 形成致密微球后, 均可在室温及缺氧环境下存活约 10 d; 其机制主要归因于成球后细胞代谢率与增殖活性降低, 细胞进入休眠样状态, 从而耐受低温与低氧^[60]。类似地, ESCs 微球在常温条件下亦可维持活性达 4 d, 且功能未见明显受损^[60-61]。上述结果提示, 具备成球能力的细胞类型适于常温包装长途运输, 无需依赖严苛的温控或深低温设备。因此, 基于球状体的细胞递送策略有望突破现有冷链瓶颈, 大幅降低细胞治疗产品的物流成本与操作难度。

1.9 不同分化路径的优劣比较与工业化前景

PSCs 向 MSCs 的分化路径, 体现了该领域从 PSCs 谱系特化(lineage specification)规律探索向细胞工程化制备的范式演进。早期的共培养法和细胞群挑选法, 率先验证了 PSCs 体外定向分化为 MSCs 的可行性, 并据此确立了基于 ISCT 表型与三系分化潜能的质控基准^[33-34]。上述方法因依赖异种饲养层或人工挑选, 导致批间重复性欠佳, 难以契合 GMP(Good Manufacturing Practice)规范要求, 故工业化潜力受限。相较之下, 类胚体法、中胚层法、NCCs 法、NMPs 法和滋养层法则借助特定细胞因子与小分子抑制剂的组合, 精准锚定于特定发育节点, 进而驱动细胞沿既定谱系定向分化, 显著提升了诱

导效率与过程的可控性。

除谱系诱导逻辑的优化外, 培养模式的革新进一步为临床转化提供了关键支撑。3D悬浮微球体系并非独立谱系路径, 而是兼具普适性的工艺升级方案。尤其致密 MSCs微球可在室温和缺氧条件下维持休眠状态存活长达 10 d^[60], 其规模化适配性也使其成为当前工业级PSC-MSCs工艺开发的核心方向之一。

综上, 不同分化路径在诱导原理、工艺复杂度及临床转化潜力上存在显著差异(表 2), 从 CMC(chemical, manufacturing and control)视角审视, 未来PSC-MSCs制备工艺的演进将聚焦于: (1) 无动物源、化学成分明确培养体系; (2) 封闭式自动化生产; (3) 3D悬浮生物反应器扩增; (4) 在线质量监控与标准化放行检测。由此可见, 相较于传统2D贴壁工艺, 集成上述特征的3D悬浮培养模式更契合大规模细胞药物的生产需求, 因而被视为最具产业化前景的工艺路线。

2 PSCs向MSCs分化的质量评价体系

生产临床级PSC-MSCs面临着显著挑战, 关键在于构建一套完善的质量评价体系, 以实施贯穿产品全生命周期的质量管理。该体系需严格遵循 cGMP(current Good Manufacturing Practice)规范, 对原材料进行严格的风险评估与质量控制, 并开展涵盖细菌、支原体、特定病毒及内毒素检测等项目的全面微生物安全性评价, 以满足产品的基本质量要求。根据细胞药物制备不同阶段不同质控的要求, 我们将PSCs向MSCs分化的质量评价体系分为PSCs

质量评价和PSC-MSCs质量评价两部分进行介绍。

2.1 PSCs的质量评价

自 1998年 ESCs建系以来, 临床级 ESCs的质量评价标准已不断发展和完善。在细胞风险控制层面, 有学者建议人 ESCs的质量评价应涵盖细胞鉴别、微生物学安全性、干性、多能性及活性等关键指标, 从而保障其衍生功能细胞临床应用的安全性及有效性^[62]。为推进相关标准化进程, 国内专家于2020年共同制定了《人胚干细胞》团体标准^[63]。基于此, 本文对PSCs的主要质量要求进行了总结(表3)。

2.1.1 鉴别 PSCs可以通过一组与它们多能状态密切相关的标记物进行区分。其中, 最为熟知的细胞干性标志物包括POU结构域5类转录因子1(POU domain, class 5, transcription factor 1, POU5F1; 又称 OCT4)、SOX2和NANOG, 细胞表面的多能性标记物包括肿瘤排斥抗原-1-60(tumor rejection antigen-1-60, TRA-1-60)、肿瘤排斥抗原-1-81(tumor rejection antigen-1-81, TRA-1-81)、阶段特异性胚胎抗原-3(stage-specific embryonic antigen-3, SSEA-3)以及阶段特异性胚胎抗原-4(stage-specific embryonic antigen-4, SSEA-4)。这些标记物的联合检测是鉴别PSCs的常用方案^[64]。流式细胞检测法是鉴别PSCs的常用方法。值得注意的是, SSEA-1是小鼠多能干细胞的经典标志物, 但在未分化的PSCs中不表达, 而在其发生分化后会开始表达。

2.1.2 遗传完整性 PSCs在长期培养过程中受到不同的传代因素影响, 可能会发生遗传改变^[65-66], 有必要在关键节点(如建立主细胞库和分化为可移植

表2 不同分化路径产生的PSC-MSCs的核心特征与工业化前景

Table 2 Core characteristics and industrial prospects of PSC-MSCs produced through different differentiation pathways			
方法 Methods	优点 Advantages	局限性 Limitations	工业化潜力 Industrial potential
Co-culture	Simulates developmental processes	Contains xenogeneic cells, unfavorable for GMP manufacturing	Low
Cell sorting	Simple operation	Highly subjective, poor reproducibility	Low
Embryoid body method	Clear developmental basis	High heterogeneity	Medium
Mesoderm route	High efficiency, good controllability	Multiple steps	High
Neural crest route	Clear developmental basis, high efficiency	A large body of literature	High
NMP route	Unique developmental origin	Limited literature	To be determined
Trophoblast route	Unique developmental origin, prominent immunomodulation	Ongoing clinical trials	High
3D spheroid system	Easy to scale up, with reduced costs	High requirements for process standardization	Very high

表3 PSCs质量标准要求
Table 3 Quality standards for PSCs

项目 Item	项目亚类 Sub-item	标准要求 Standard requirements
Cell passage		≤60 passages
Cell viability		Cell survival rate: ≥90% before freezing, ≥60% after thawing
Cell identification	Cell morphology	Colony-like growth, clear colony edges, high nuclear-to-cytoplasmic ratio, uniform morphology, and tight cell-to-cell contact within colonies
	Genetic identification	Possesses 16 human STR loci: D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820, AMEL, PentaE, PentaD
	Karyotype analysis	46,XX or 46,XY
	Positive markers	SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81; at least 2 of these markers shall be tested, with positive cell rate ≥70.0%
	Pluripotency/stemness markers	OCT4, NANOG, SOX2; at least 2 with positive rate ≥70.0%
	Negative markers	SSEA-1 positive cell rate <10%
Stemness properties	Alkaline phosphatase activity	Positive for alkaline phosphatase staining
Pluripotency testing	Teratoma formation ability	Capable of forming teratomas comprising representative tissues of the three germ layers
	Multilineage differentiation potential	Can differentiate into precursor cells of the three germ layers under specific conditions, such as ectoderm-derived neural precursors, mesoderm-derived myocardial precursors, and endoderm-derived hepatic precursors
Microbiological safety testing		(1) Negative for fungi, bacteria, and mycoplasma; (2) Negative for HIV (human immunodeficiency virus), HBV (hepatitis B virus), HCV (hepatitis C virus), HTLV (human T-cell lymphotropic virus), EBV (Epstein-Barr virus), HCMV (human cytomegalovirus), and <i>Treponema pallidum</i>

细胞前)对其遗传完整性进行验证。核型分析、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析、短串联重复序列(short tandem repeat, STR)检测、全基因组光学图谱(optical genome mapping, OGM)、下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)、微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)等技术,可检测细胞的DNA“指纹”,用于评估遗传稳定性和鉴定细胞身份。

研究表明, ESCs在长期培养中可保持较好的核型稳定性。例如, H9 ESCs培养至48代、PKU1 ESCs培养至125代时仍保持正常核型^[67]; SHEF-1 ESCs在与饲养层共培养条件下,至215代时染色体依然正常^[68]。SNP分析也显示,长期培养的H7和H9 ESCs中未见显著拷贝数变异或杂合性缺失,提示这两株细胞的基因组相对稳定^[69]。此外,对美国NIH注册的多个ESC系进行STR图谱分析,发现除NTERA-2外,所有ESC系均表现出高度纯合的STR多态性特征,且高代次细胞仍保持该特征^[69]。OGM技术也应用于基因编辑后的iPSC克隆鉴定,曾发现约15%的克隆存在非预期结构变异^[70]。目前,NGS已成为国内外指导原则中推荐的核心工具,常用于

细胞库及高代次细胞的全基因组测序或全外显子测序,以筛查相关突变并监测分化过程中的遗传变异^[71-72]。

2.1.3 干(细胞)性和多能性 干性和多能性是PSCs的基本生物学特性。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性检测法是快速评估其“干性”的常用方法。未分化的ESC和iPSCs均高表达AP,染色呈红色或紫色,而已分化细胞则基本无色。在体外,PSCs具有多向分化潜能,在一定条件下可分别分化为源自3个胚层的各类前体细胞,如外胚层的神经前体细胞、中胚层的心肌前体细胞和内胚层的肝前体细胞。此外,将PSCs移植到免疫缺陷小鼠体内可形成畸胎瘤,这种体外多向分化能力和体内畸胎瘤形成能力是PSCs多能性的核心特征。其中,畸胎瘤形成实验常被视为多能性的“金标准”,还能在一定程度上评估分化细胞中是否残留PSCs及其可能带来的潜在风险。

2.2 PSC-MSCs的质量评价

依据官方发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》、《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》、《细胞治疗产品研

表4 PSC-MSCs的质量评价指标
Table 4 Quality assessment parameters for PSC-MSCs

评价类别	质量检测项目	主要评价方法及内容
Evaluation category	Quality assessment item	Main evaluation methods and contents
Biological characteristics analysis	Morphology	Morphological observation
	Cell viability and proliferation	Cell viability, population doubling time, cell cycle, etc.
	Individual genetic polymorphism or STR (short tandem repeat) analysis	Evaluate independent individual origin, purity, and possible cross-contamination with other human cells
	Interspecies cell contamination	Isozyme analysis or species genetic polymorphism gene analysis, e.g., cytochrome b gene polymorphism-based nucleic acid amplification to evaluate species characteristics and interspecies cross-contamination
	Cell surface markers	Positive markers (CD73, CD90, CD105) and negative markers (CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR)
Microbiological safety testing	Karyotype analysis	G-banding analysis
	Sterility testing	Detection of bacteria and fungi
	Mycoplasma	Culture method/indicator cell culture method (DNA staining method)
	Bacterial endotoxins	LAL (Limulus ameobocyte lysate) test, gel-clot method, photometric method, etc.
	Human-specific viruses	HIV, HBV, HCV, HTLV, EBV, HCMV, <i>Treponema pallidum</i> , human parvovirus B19, various subtypes of HPV (human papillomavirus), HHV-6 (human herpesvirus 6), HHV-7 (human herpesvirus 7), and other specific viruses
Biological safety evaluation	Endogenous and exogenous pathogenic factor contamination	Detection of bovine-derived viruses, porcine-derived viruses, murine-derived viruses, retroviruses, etc.
	Tumorigenicity	(1) <i>In vivo</i> : subcutaneous injection in nude mice; clinical administration route test; (2) <i>In vitro</i> : soft agar colony formation assay, telomerase activity detection
	Abnormal immune response	Detection of allogeneic immune cell proliferation/activation (e.g., total lymphocyte proliferation), and evaluation of pro-inflammatory cytokine (e.g., IFN- γ and TNF- α) release by activated immune cells
	Impurity/residue testing	(1) Unintended residual cells in the product itself, such as ESCs residue, residues of other germ layer cells, etc.; (2) Specific culture medium components, additives, or impurities remaining from the manufacturing process, such as bovine serum albumin, trypsin, antibiotics, DMSO (dimethyl sulfoxide), etc.
Biological efficacy	Paracrine function evaluation	Determine the secretion levels of various cytokines that promote tissue cell proliferation, protect cells from apoptotic damage, and promote angiogenesis
	Immunomodulatory function	(1) Evaluation of the ability to inhibit human lymphocyte proliferation; (2) Evaluation of the function to inhibit pro-inflammatory lymphocyte subsets (Th1 and Th17); (3) Evaluation of the effect on promoting the proliferation of Treg lymphocyte subsets; (4) Evaluation of the regulatory effect on immune cells releasing the pro-inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10; (5) Detection of the function of expressing immunosuppressive molecules (e.g., IDO1 and PD-L1)

究与评价技术指导原则(试行)》^[73-75], 以及结合PSC-MSCs现有研究报道, 本文系统梳理了PSC-MSCs的关键质量属性, 主要从4个核心维度(生物学特性分析、微生物学安全性检测、生物学安全性评价、生物学有效性)展开评价(表4), 内容涵盖了细胞形态、鉴定、活力(细胞存活率、活细胞数量、功能性细

胞数量、群体倍增时间等)、基因组稳定性、纯度检测、生物学活性(如分化能力和特定标志物表达)、关键功能测定[如抑制T细胞增殖或吲哚胺2,3双加氧酶(indoleamine 2,3-deoxygenase, IDO)表达]、微生物安全性(细菌、支原体和内外源病毒及内毒素检测)、成瘤性/致瘤性实验等, 旨在为PSC-MSCs的

规范化研究与质量可控性提供系统依据。

2.2.1 最低鉴别标准 2006年ISCT首次定义了人类MSCs的最低鉴别标准(以下称“旧版标准”)^[30]。(1) 呈贴壁生长: 在标准培养条件下, MSCs会附着在培养容器表面上生长; (2) 表面标记物: MSCs表达特定表面标志物(如CD73、CD90和CD105), 同时不表达造血和内皮标记物[如CD34、CD45、CD14(或CD11b)、CD79a(或CD19), 以及HLA-DR]; (3) 体外三系分化能力: 在体外可分化为成骨细胞、成脂肪细胞和成软骨细胞^[30]。ST-MSCs的质量控制一直遵循此标准。此后, 中国细胞生物学学会制定并发布了团体标准《人间充质干细胞》^[76], 一些省份如陕西省还制定了地方性标准《人间充质干细胞库建设与管理规范》等^[77], 这些标准旨在规范和指导ST-MSCs的制备、检测和储存过程, 确保其质量和安全性, 以满足临床应用的需求。

经典表面标志物CD105、CD73和CD90是ISCT明确规定的MSCs最低鉴定标准, 是人体组织来源MSCs所共有的基本特征。然而, 这些标志物主要用于鉴定MSCs的“身份”, 在MSCs的全面质量评价中, 仅依赖此类表型标准不足以充分反映其复杂的生物学特性和治疗效力, 因此, 需进一步结合功能学评价和分子表征以系统评估其临床应用的安全性和有效性^[78]。早在2013年, ISCT即建议在

MSCs的质量控制体系中纳入对其免疫调节功能及旁分泌活性的评估^[79]。2019年, ISCT进一步明确了MSCs的功能定义, 并推荐附加3个维度来界定“MSCs”的内涵^[80]。(1) 细胞组织来源的标注: 强调细胞来源的特异性, 如骨髓来源、脂肪组织来源和脐带组织来源的MSCs, 可分别简写为BM-MSCs、AD-MSCs和UC-MSCs; (2) 干细胞特性的证据: 除非有严格的体外和体内数据支持其干细胞特性, 方可视为间充质干细胞, 否则应将这些细胞视为间充质基质细胞; (3) 功能性检测的矩阵: 推荐使用一系列功能性检测来证明MSCs的属性, 这些属性并非MSCs的通用定义, 而是源于其分泌营养因子和免疫调节特性所产生的临床效用, 但不是其“干性”或向结缔组织分化的潜能^[80]。通过更准确的术语使用和功能评估, 有助于避免由于术语混淆而可能引起的误解和不切实际的效用期望, 提升MSCs研究应用的科学性, 并推进质量评价的标准化。

随着对MSCs治疗机制研究的不断深入, 2025年发布的新版标准^[31]在旧版标准^[30]基础上做出了重大革新(表5)。首先, 新版标准排除了“标准培养条件下的贴壁生长特性”和“干性”两项传统的鉴别指标, 这是基于上述指标无法有效区分MSCs与其他真正的干细胞, 从而明确了MSCs的治疗作用不是依赖于干细胞特性, 而是其分泌功能和免疫调节活性。其

表5 ISCT关于MSCs最低标准共识新旧版本的主要差异对比
Table 5 Key differences between the original and revised ISCT minimal criteria for MSCs

项目 Item	旧版标准(2006年) Original criteria (2006)	新版标准(2025年) Revised criteria (2025)
Growth morphology	Not specified	Not required
Cell marker expression	≥95% positive for CD73, CD90, and CD105; ≤2% positive for CD34, CD45, CD11b (or CD14), CD19 (or CD79a), and HLA-DR	(1) MSCs must be defined by both positive and negative markers; (2) The flow cytometry threshold (cell percentage) for defining a marker as positive or negative should be detailed in the methodology section; (3) Flow cytometry results (percentage of positive cells) for each positive and negative marker should be reported; (4) Positive markers used to define MSCs must be reported. Reliable examples include CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , and CD105 ⁺ ; if other markers are used, they should also be reported; (5) Negative markers used to define MSCs must be reported (must include CD45 ⁻); if other tissue-specific markers are used, they should also be reported
<i>In vitro</i> differentiation potential	Capable of osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation <i>in vitro</i>	Not required
Tissue origin	Not required	Tissue origin of MSCs must be described (any tissue can serve as a starting material)
Functionality	Not required	Cell biological properties and potency must be evaluated

次,新版标准强化了表型定义的严谨性与实验的可重复性,要求细胞表面标志物需设定流式检测阈值与结果百分比。ISCT专家一致认为,尽管目前尚不能够特异性定义MSCs的单一标志物,但对其阳性和阴性细胞表面标志物的表达水平进行定量报道是评价细胞制剂纯度和一致性的重要基础。此外,由于MSCs的表面标志物表达受组织来源及体外培养扩增过程的影响,研究者应根据具体情况灵活增加其他相关标志物,以实现更全面的细胞表征^[31]。再次,新版标准明确要求注明MSCs的组织来源(如脂肪、骨髓、脐带等),以提示其表型和功能上可能存在的差异。最后,新版标准更加注重对MSCs特性与效力的关键质量属性的评估,以期确保细胞产品不仅符合表型标准,更能具备可预期的治疗功能。

2.2.2 纯度鉴别 当前,绝大多数PSC-MSCs的研究仍参照ISCT旧版标准,将CD73、CD90、CD105作为鉴别PSC-MSCs的阳性表面标记物。但需注意的是CD105在PSCs向MSCs分化过程中表达相对滞后^[47]。此外,仅依赖这些典型MSCs标志物的高表达,尚不足以在分化的PSCs培养物中明确区分MSCs与其他前体细胞^[81]。鉴于此,越来越多的研究引入了其他阳性表面标记物以辅助鉴别PSC-MSCs。例如,CD29是细胞与细胞外基质黏附的关键分子,参与维持MSCs的贴壁生长特性,CD54[又称细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)]在MSCs表面呈高表达,尤其在炎症或损伤微环境中可显著上调^[82],CD146参与血管生成及免疫调节,调控MSCs的迁移和归巢。CD166是MSCs的核心黏附分子之一,参与维持干细胞微环境稳态^[82-83]。尽管这些鉴别指标目前尚未成为业内共识,但其引入可为PSC-MSCs的功能相关性鉴别提供更综合的参考依据。

旧版标准将CD34、CD45、HLA-DR、CD14(或CD11b)以及CD79a(或CD19)列为鉴别MSCs的阴性表面标记物^[30],旨在有效排除非目标细胞,从而保证MSCs群体的特异性,并确保其功能发挥所需的纯度。具体而言,CD34是内皮细胞或造血干细胞标志物;CD45为泛白细胞标志物,主要用于识别淋巴细胞、粒细胞等造血系统来源细胞;HLA-DR通常不在MSCs表面表达,其阴性表达被认为是评估MSCs低免疫原性的重要表型特征;然而,MSCs在IFN- γ 等炎症因子刺激下,HLA-DR表达可被诱导

上调。CD79a是B细胞的主要标志物;CD14在单核细胞和巨噬细胞中呈高表达,因此可用于鉴别ST-MSCs,尤其是BM-MSCs培养物中最常见的造血来源细胞污染^[30]。

此外,由于PSCs向MSCs体外诱导分化工艺特殊,若培养体系中残存未完全分化的PSCs,理论上可能存在体内形成良性肿瘤(如畸胎瘤)的风险,从而给PSC-MSCs的临床应用的安全性构成潜在影响。目前可采用多种方法(如流式细胞术、PCR等)检测PSCs残留,其中ddPCR方法灵敏度较高,可达到 1×10^6 个细胞中检出1个PSC。因此,检测PSCs的表面标记物(例如OCT4、NANOG、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81等)可用于评估终末分化细胞中PSCs的残留水平,以提升细胞制剂的安全性和质量可控性。

2.2.3 致癌性评价 MSCs产品中残留的未分化细胞或转化细胞可能存在致癌风险,致癌性是干细胞产品质量控制及安全性评价的重点关注内容。根据NMPA于2024年1月发布的《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则(试行)》^[84],基于传统啮齿类长期致癌实验(2年周期)无法模拟干细胞体内动态分化过程,应选择成瘤性(tumorigenicity)和致瘤性(oncogenicity)实验来评价干细胞产品的致癌性潜力。

致瘤性是指细胞终产品经拟定临床给药途径移植或输注至动物体内后,诱导宿主正常细胞发生恶性转化并形成肿瘤的能力,其实验目的是检查细胞裂解物、细胞DNA等成分是否能诱导动物体内细胞形成肿瘤。成瘤性是指细胞接种到动物后,由接种细胞本身形成肿瘤的能力,属于细胞自身特性的鉴定。现行《中国药典》三部《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制》附录2和附录3,已分别对成瘤性检查法和致瘤性检查法的具体实验方法作出要求。由于PSCs具有形成畸胎瘤的固有特征,其分化的PSC-MSCs成瘤风险通常被认为高于ST-MSCs。值得注意的是,不管哪种组织来源的MSCs,在长期传代培养过程中,都存在因氧化应激、DNA复制错误或表观遗传失调等因素而发生恶性转化的理论可能性。目前此类事件在实际中报道极少,可能与其发生率极低有关。

目前MSCs的成瘤性评价主要包括体外实验(软琼脂克隆形成实验、端粒酶活性检测等)和动物体内实验法。Lai等^[85]采用改良的SYBR Green实

时定量端粒重复序列扩增测定法(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)来检测端粒酶活性,发现ESC-MSCs细胞系Hues9.E1培养至第22代后,端粒酶活性显著低于阳性对照组永生化人类胚胎肾细胞系HEK细胞。Tan等^[86]将 1×10^7 个E1-MYC细胞(即经MYC基因转化的ESC-MSCs)注射于裸鼠右侧胸壁皮下,结果显示,所有注射成纤维肉瘤细胞HT-1080组小鼠(阳性对照)均形成原发肿瘤,部分伴随肺转移和淋巴结转移;而E1-MYC组和MRC-5(正常成纤维细胞)组小鼠在注射部位及全身均未发现肿瘤或异常病变,提示该条件下E1-MYC细胞在裸鼠模型中无成瘤性。另有研究报道,在免疫缺陷的NOD/SCID小鼠皮下注射T-MSCs悬液或T-MSCs微球90 d后,以及在免疫功能正常的猴子中静脉注射T-MSCs悬液或T-MSCs微球60 d后,均未发现肿瘤形成^[51,87]。此外,ESCs定向分化获得的间充质特性的细胞IMRCs在SCID小鼠中未形成畸胎瘤,而其来源ESCs可形成畸胎瘤^[37]。这些研究表明,在上述实验条件下,PSC-MSCs的成瘤(包括畸胎瘤)风险相对极低。

2.2.4 生物学特性 PSC-MSCs(以ESC-MSCs为例)与ST-MSCs在生物学特性方面表现出一定差异。与BM-MSCs相比,ESC-MSCs通常细胞体积更小,增殖速度更快,衰老进程也更为缓慢,并可产生更高水平的抗炎因子PD-L1和更低水平的促炎因子IL-6和IL-8^[48]。在表面标志物方面,ESC-MSCs的CD90和CD105的表达水平和三向分化能力一般低于BM-MSCs^[88],但这不影响其免疫调节能力,其反而在IFN- γ 诱导下表现出更强的抗炎活性^[89]。与UC-MSCs相比,从ESCs定向分化获得的IMRCs在自我更新能力上显示出显著优势,在传代至第15代时,其增殖速度仍显著高于UC-MSCs,这在一定程度上解决了原代细胞扩增能力有限的问题^[37]。

ESC-MSCs表现出良好的免疫调节能力。经IFN- γ 刺激后,IMRCs高表达IDO1,并能分泌更高水平的抗炎因子[如IL-1RA(interleukin-1 receptor antagonist)、LIF(leukemia inhibitory factor)、RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, 又称CCL5)]和促修复因子[如VEGFA(vascular endothelial growth factor A)、SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 alpha, 又称CXCL12)、MIG(monokine induced by interferon-gamma, 又称CXCL9)],同时能低表达8种促炎细

胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、GRO- α 、IFN- α 2、IL-1 α 、IL-3和IL-8)^[37]。与BM-MSCs和AD-MSCs相比,Royan H6 ESCs衍生的ESC-MSCs能够显著抑制外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的增殖,并抑制促炎因子IFN- γ 的分泌,同时促进抗炎细胞因子如TGF- β 和IL-10的分泌^[90]。本课题组前期研究显示,BM-MSCs和T-MSCs在TNF- α 刺激下均促进了促炎介质IL-6、IL-8和CCL2的分泌。然而,IFN- γ 刺激诱导了BM-MSCs中IL-6、CXCL10和CCL2的分泌,但对T-MSCs中这些促炎介质的分泌没有显著影响^[48]。另外,在IFN- γ 诱导下,ESC-MSCs表达的HLA-DR水平低于BM-MSCs,这可能与较低的CIITA(class II major histocompatibility complex transactivator)表达有关^[91]。这些发现提示ESC-MSCs在免疫调节和抗炎特性方面可能具有一定特点。未来仍需深入探讨PSC-MSCs与ST-MSCs的生物学差异及其形成机制,通过精准调控关键基因和信号通路,整合两者的优良特性,为不同来源MSCs的功能优化、规模化制备及临床标准化应用提供理论依据和技术支撑。

2.2.5 功能性评价 随着2019年ISCT发布MSCs需有功能性定义的建议后,国际上越来越多的实验室开始将功能性评价列于MSCs质量控制体系中,以弥补传统表面标志物检测方法的不足。功能性评价主要包括旁分泌因子分析和免疫调节功能测试。

MSCs通过分泌多种生物活性物质(统称为“分泌组”)介导治疗作用,对其进行定量和定性分析是功能评价的关键环节。

MSCs分泌组包括可溶性因子和小细胞外囊泡(small extracellular vesicles, sEVs),它们可促进细胞增殖、分化、免疫调节、血管生成、创伤愈合及组织再生等。可溶性因子主要包括:生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1);以及免疫调节因子IL-10、肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(tumor necrosis factor α -stimulated gene 6, TSG-6)、TGF- β 1和IDO等^[92]。Lotfinia等^[93]通过蛋白质阵列筛选分析ESC-MSCs的分泌组,发现VEGF是ESC-MSCs分泌的35种高表达蛋白之

一,与细胞增殖、细胞迁移、发育过程、免疫系统过程和凋亡的调节有关,该研究还发现ESC-MSCs中存在高表达的介质,包括血管生成素、IGFBP2、TGF- β 1和MCP-1等,且其抗炎特性相较于BM-MSCs更为显著。

sEVs是细胞主动释放的纳米级膜性结构,主要包括外泌体(exosomes,直径40~100 nm)和微泡(microvesicles,直径0.1~1.0 μ m),可携带蛋白质、核酸(如mRNA、miRNA)、脂质等,是细胞间通信的重要媒介^[94]。研究表明,在多种动物疾病模型中,MSC-sEVs显示出较好的治疗潜力,但其作用机制复杂,可能因环境和疾病状态的不同而有所差异。研究普遍认为,MSC-sEVs发挥功能的核心基础在于其能将生物信息传递到靶细胞^[94]。目前对于ESC-MSCs-sEVs的研究主要集中在其形态、大小、经典蛋白质标记鉴别等。一项基于动态光散射技术的研究发现,从Royan H6 ESCs衍生的ESC-MSCs中所提取的sEVs,其粒径约为220 nm,蛋白质免疫印迹分析进一步发现,这些sEVs表达CD81、TSG-101和CD63等阳性蛋白,而不表达阴性标志蛋白Calnexin^[95]。

MSC-sEVs通常表现出良好的生物安全性和生物相容性以及较低的免疫原性,可避免突变或损伤的遗传物质细胞核转移风险,能够穿过血脑屏障,被视为是生物治疗的理想手段^[96-97]。部分研究通过对MSC-sEVs的基因改造以增强其靶向能力和治疗效果。例如,Wu等^[98]经疏水插入法以纤维蛋白靶向肽CREKA(半胱氨酸-精氨酸-谷氨酸-赖氨酸-丙氨酸, Cys-Arg-Glu-Lys-Ala)修饰MSC-sEVs,显著增强了后者与纤维蛋白结合、在目标组织中富集与滞留的能力,并通过协同调控炎症反应与促进成骨分化,加快骨骼组织的修复进程。

另外, MSCs分泌的sEVs在神经系统损伤的修复中起着重要作用^[99-100]。Xian等^[101]研究发现,用MSC-sEVs处理脂多糖刺激的原代海马星形胶质细胞,可减轻炎症诱导的星形胶质细胞损伤,并且MSC-sEVs可通过Nrf2-NF- κ B信号通路抑制小鼠的星形胶质细胞活化。Kim等^[102]采用被动孵育法将增强型脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)神经肽装载至MSC-EVs中,所得MSC-EV-NPs经鼻内递送绕过血脑屏障,在体外、离体和在体实验中显著上调BDNF表达,并促进神经发生及增强神经保护作用,在光血栓性脑卒中模型中

减小梗死体积,该效应由环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cyclic AMP response element-binding protein, CREB)磷酸化介导的神经保护通路驱动。He等^[103]发现, MSCs分泌的外泌体通过递送miR-100-5p抑制靶基因还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4)的表达,进而通过调控Nox4-ROS-Nrf2轴减少ROS的产生,减轻氧化应激,从而减轻帕金森病模型中的多巴胺能神经元损伤。

免疫调节功能是MSCs发挥治疗作用的重要机制之一,该过程高度依赖于其与炎症部位组织微环境的相互作用。现有报道中显示,与ST-MSCs相比, PSC-MSCs通常分泌更高水平的抗炎细胞因子(如TGF- β 、IL-10等)和生长因子HGF及趋化因子,这些因子协同抑制T细胞、B细胞和NK细胞的增殖和活化,并可促进Tregs的生成,从而发挥免疫耐受作用^[80,104],其具体机制涉及多种关键介质。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是MSCs抑制T细胞增殖的关键介质之一。MSCs与T细胞的直接接触,或炎症微环境中促炎因子如IFN- γ 和TNF- α 的刺激,均可显著激活MSCs中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达。iNOS通过催化精氨酸生成NO,进而发挥免疫调节作用。NO能特异性地抑制T细胞中信号转导和转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, Stat5)的磷酸化,从而阻断T细胞的增殖信号通路,最终实现对T细胞活化和增殖的抑制^[105]。Shahsavari等^[106]发现,犬源性iPSC-MSCs的iNOS表达水平显著高于犬源性AD-MSCs和BM-MSCs;与未处理组比较,经TNF- α 和IFN- γ 联合刺激后,iPSC-MSCs中iNOS的表达水平显著升高,增幅接近10倍。

IDO1是MSCs发挥免疫调节作用的关键细胞内蛋白。尽管MSCs自身几乎不表达IDO1,但在炎症微环境下,促炎因子如IFN- γ 可诱导其表达。在GVHD的发生和发展过程中,IFN- γ 刺激能显著上调BM-MSCs中IDO1的表达水平,且IDO1的表达水平与IFN- γ 浓度呈正相关^[107],提示MSCs在IFN- γ 刺激下的免疫调节能力也随之增强。

Polchert等^[108]研究进一步揭示了IFN- γ 诱导IDO1表达和功能的剂量依赖性特征,使用500 U/mL的IFN- γ 预激活BM-MSCs可最大程度激活IDO1,并显著减轻GVHD模型鼠的疾病程度,使其存活率提

升至100%;而未经任何处理或低剂量刺激的BM-MSCs则治疗效果有限。

在ESC-MSCs与T细胞共培养的实验中,IDO1通过抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖发挥免疫调节作用。IDO1的作用机制在于,它催化色氨酸分解,消耗T细胞增殖和活化所需的色氨酸。此外,IDO1的代谢产物犬尿氨酸及其衍生物具有直接的免疫抑制作用,能够诱导T细胞凋亡或增强Tregs的活性^[109]。在ESC-MSCs治疗小鼠关节炎动物实验中发现,IDO1通过直接作用于宿主T细胞来减轻关节炎,而宿主T细胞又通过小鼠树突细胞(dendritic cells, DCs)诱导IDO1的表达,提示ESC-MSCs减轻小鼠关节炎可能是宿主对异种细胞注射的非特异性反应的结果^[110]。

PD-L1,又称CD274或B7H1,是B7共刺激分子家族的关键成员,在T细胞免疫应答中主要起负向调控作用。其通过与其受体PD-1结合,介导免疫细胞的活化及功能抑制。

不同来源的MSCs的PD-L1表达模式存在差异。在正常培养条件下,在BM-MSCs中未检测到明显的PD-L1表达^[104]。在炎症微环境中,促炎性细胞因子(如IFN- γ 、TNF- α 和IL-1 β)能够显著上调MSCs中PD-L1的表达;其中BM-MSCs仅在受到高剂量IFN- γ 刺激时才会显著上调表达PD-L1。相比之下,ESC-MSCs的PD-L1基础表达水平显著高于BM-MSCs,且受IFN- γ 刺激的影响较小,提示PD-L1的持续高表达可能与ESC-MSCs针对T细胞和B细胞的免疫抑制能力有关^[48]。

ICAM-1和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1; 又称CD106)是免疫球蛋白超家族成员,参与炎症反应和免疫细胞的黏附与迁移^[111]。小鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)表达的ICAM-1和VCAM-1对体内外白细胞附着和跨内皮迁移至关重要^[112],并反映了血脑屏障状态的变化。

静息状态下脑血管内皮细胞低水平表达ICAM-1, TNF- α 诱导会显著上调VCAM-1和ICAM-1的表达,进而会导致血脑屏障通透性增加和免疫细胞浸润^[113]。有研究表明,ESC-MSCs可通过与内皮细胞直接接触以及释放旁分泌因子两种方式,逆转TNF- α 诱导的ICAM-1和VCAM-1表达上调^[114]。同样, BM-MSCs也可通过旁分泌作用抑制内皮细胞ICAM-1的表达,减少中性粒细胞黏附及向脑组织的

浸润,并进一步抑制中性粒细胞释放基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),降低其蛋白水平和酶活性,从而减轻缺血性脑卒中后血脑屏障的损伤^[115]。相较于BM-MSCs, ESC-MSCs可展现出更强的抑制效应,不仅通过减少免疫细胞黏附缓解血脑屏障通透性异常,还通过抗氧化应激和调节细胞间连接蛋白(如ZO-1)促进血脑屏障修复^[114]。这一双向调控机制为ESC-MSCs在神经炎症性疾病(如多发性硬化症)中的治疗应用提供了潜在分子靶点和病理生理依据。

3 结论与展望

本文简述了MSCs的起源历史与定义演化,系统介绍了PSCs向MSCs不同路径的分化工艺和质量评价,重点阐述了ESC-MSCs的研究进展,以期PSC-MSCs产品的研发与临床转化提供参考支持。相较于发展相对成熟的ST-MSCs, PSCs向MSCs的分化技术仍较为复杂,工艺成熟度与标准化仍是领域内持续探索的方向。二者在细胞表型、基因表达谱、增殖速率、衰老进程以及对特定炎症因子的免疫应答等方面均存在一定的差异。此外,不同组织来源及表观遗传特征对MSCs体内功能的影响机制,仍需深入探索。

MSCs临床转化面临的主要挑战之一在于其功能异质性,这可能与组织来源的差异、体外培养条件波动以及传代所致的表观遗传漂变等因素有关,以致产生临床试验结果出现不一致的情况^[116]。通过采用单细胞基因测序和基因条形码追踪来分析MSCs亚群,建立细胞质量分级评价体系(如功能性评价建立效力检测阈值)、基因工程改造(导入微环境响应元件)和动态质量监控(关联冻存参数与功能稳定性),有望将MSCs的异质性转化为“可控多样性”,从而推动MSCs治疗从通用型制剂转向功能定制化方向发展。与此同时,生物医学新技术领域的监管体系日趋完善,为干细胞等产品的临床研究与转化提供了明确的制度化路径。相信在技术进步与制度保障的双重驱动下,基于MSCs的先进治疗产品有望朝着更安全、有效和可控的方向持续发展。

参考文献 (References)

- [1] Han X, Liao R D, Li X, et al. Mesenchymal stem cells in treating human diseases: molecular mechanisms and clinical studies [J].

- Signal Transduction and Targeted Therapy, 2025, 10(1): 262.
- [2] Jiang B, Yan L, Wang X Y, et al. Concise review: Mesenchymal stem cells derived from human pluripotent cells, an unlimited and quality-controllable source for therapeutic applications [J]. Stem Cells, 2019, 37(5): 572-581.
- [3] Fu S Y, Yeung C K, Xu R H. Pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells for therapeutic applications, developmental study, and cancer research [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2025, 92: 102327.
- [4] Kim I, Bang S I, Lee S K, et al. Clinical implication of allogenic implantation of adipogenic differentiated adipose-derived stem cells [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2014, 3(11): 1312-1321.
- [5] Lee J W, Lee S H, Youn Y J, et al. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction [J]. Journal of Korean Medical Science, 2014, 29(1): 23-31.
- [6] Park Y B, Ha C W, Lee C H, et al. Cartilage regeneration in osteoarthritic patients by a composite of allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel: results from a clinical trial for safety and proof-of-concept with 7 years of extended follow-up [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2017, 6(2): 613-621.
- [7] Cho Y B, Park K J, Yoon S N, et al. Long-term results of adipose-derived stem cell therapy for the treatment of Crohn's fistula [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2015, 4(5): 532-537.
- [8] Kurtzberg J, Abdel-Azim H, Carpenter P, et al. A phase 3, single-arm, prospective study of remestemcel-l, *ex vivo* culture-expanded adult human mesenchymal stromal cells for the treatment of pediatric patients who failed to respond to steroid treatment for acute graft-versus-host disease [J]. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2020, 26(5): 845-854.
- [9] Nam J Y, Lee T Y, Kim K, et al. Efficacy and safety of Lenzumestrocel (Neuronata-R® inj.) in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALSUMMIT study): study protocol for a multicentre, randomized, double-blind, parallel-group, sham procedure-controlled, phase III trial [J]. Trials, 2022, 23(1): 415.
- [10] Wada K, Takeuchi A, Katayama Y, et al. Combined treatment with mesenchymal stem cells and therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: a phase 1/2 randomized trial [J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 16302.
- [11] Gupta P K, Dutta S, Kala S, et al. Phase IV postmarketing surveillance study shows continued efficacy and safety of Stempeucel in patients with critical limb ischemia due to Buerger's disease [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2021, 10(12): 1602-1613.
- [12] Kawaguchi H. Stem cell therapy for spinal cord injury: lessons from Japan's experiment in regulatory deregulation [J]. The Spine Journal, 2026, 26(7): 1239-1242.
- [13] Scott L J. Darvadstrocel: a review in treatment-refractory complex perianal fistulas in Crohn's disease [J]. BioDrugs, 2018, 32(6): 627-634.
- [14] Yamaguchi T. A new treatment option for complex perianal fistulas in Crohn's disease patients; development of darvadstrocel (allogeneic expanded adipose-derived mesenchymal stem cells) in Japan [J]. Folia Pharmacologica Japonica, 2024, 159(3): 150-155.
- [15] Nagase T, Yasuhara T, Kin K, et al. Therapeutic effects of intracerebral transplantation of human modified bone marrow-derived stromal cells (SB623) with voluntary and forced exercise in a rat model of ischemic stroke [J]. Experimental Neurology, 2025, 386: 115145.
- [16] U.S. Food & Drug Administration. FDA approves remestemcel-L-rknd for steroid-refractory acute graft versus host disease in pediatric patients [EB/OL]. (2024-12-18) [2026-08-09]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-remestemcel-l-rknd-steroid-refractory-acute-graft-versus-host-disease-pediatric>.
- [17] 国家药品监督管理局. 国家药监局附条件批准艾米迈托赛注射液上市 [EB/OL]. (2025-01-02) [2026-08-09]. <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanli/cxylqx/cxypxx/20250102192741146.html?m=>.
- [18] Tyndall A. Successes and failures of stem cell transplantation in autoimmune diseases [J]. Hematology, American Society of Hematology, Education Program, 2011, 2011: 280-284.
- [19] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [20] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(6): 824-833.
- [21] Ramos Y F M, Tertel T, Shaw G, et al. Characterizing the secretome of licensed hiPSC-derived MSCs [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2022, 13(1): 434.
- [22] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.
- [23] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Latsinik N V, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo* [J]. Transplantation, 1974, 17(4): 331-340.
- [24] Haynesworth S E, Goshima J, Goldberg V M, et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow [J]. Bone, 1992, 13(1): 81-88.
- [25] Sipp D, Robey P G, Turner L. Clear up this stem-cell mess [J]. Nature, 2018, 561(7724): 455-457.
- [26] Salem H K, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status [J]. Stem Cells, 2010, 28(3): 585-596.
- [27] Wlisset-Gendebien S, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype [J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 392-402.
- [28] Wei X, Yang X, Han Z P, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2013, 34(6): 747-754.
- [29] Caplan A I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2017, 6(6): 1445-1451.
- [30] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
- [31] Renesme L, Cobey K D, Lalu M M, et al. Delphi-driven consensus definition for mesenchymal stromal cells and clinical report-

- ing guidelines for mesenchymal stromal cell-based therapeutics [J]. *Cytotherapy*, 2025, 27(2): 146-168.
- [32] 程速远, 韩冬梅, 韦薇, 等. 间充质细胞治疗药物质量控制及审评中常见问题分析 [J]. *中国新药杂志*, 2025, 34(24): 2610-2615.
- Cheng S Y, Han D M, Wei W, et al. Analysis of common issues in quality control and evaluation of mesenchymal cell therapeutic drugs [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2025, 34(24): 2610-2615.
- [33] Barberi T, Willis L M, Socci N D, et al. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells [J]. *PLoS Medicine*, 2005, 2(6): e161.
- [34] Olivier E N, Bouhassira E E. Differentiation of human embryonic stem cells into mesenchymal stem cells by the "raclure" method [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 690: 183-193.
- [35] Brown S E, Tong W, Krebsbach P H. The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells [J]. *Cells, Tissues, Organs*, 2009, 189(1/2/3/4): 256-260.
- [36] Kimbrel E A, Kouris N A, Yavanian G J, et al. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties [J]. *Stem Cells and Development*, 2014, 23(14): 1611-1624.
- [37] Wu J, Song D Y, Li Z W, et al. Immunity-and-matrix-regulatory cells derived from human embryonic stem cells safely and effectively treat mouse lung injury and fibrosis [J]. *Cell Research*, 2020, 30(9): 794-809.
- [38] Zhao Q G, Gregory C A, Lee R H, et al. MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(2): 530-535.
- [39] Leyendecker Junior A. TGF- β inhibitor SB431542 promotes the differentiation of induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells into mesenchymal-like cells [J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 7878201.
- [40] Vodyanik M A, Yu J Y, Zhang X, et al. A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 718-729.
- [41] Roth D M, Bayona F, Baddam P, et al. Craniofacial development: neural crest in molecular embryology [J]. *Head and Neck Pathology*, 2021, 15(1): 1-15.
- [42] Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, et al. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e112291.
- [43] Wang H Y, Li D R, Zhai Z C, et al. Characterization and therapeutic application of mesenchymal stem cells with neuromesodermal origin from human pluripotent stem cells [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1683-1697.
- [44] Turco M Y, Moffett A. Development of the human placenta [J]. *Development*, 2019, 146(22): dev163428.
- [45] Ventura Ferreira M S, Bienert M, Müller K, et al. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, 9(1): 28.
- [46] Xu R H, Chen X, Li D S, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(12): 1261-1264.
- [47] Li E Q, Zhang Z W, Jiang B, et al. Generation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells in a complete serum-free condition [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14(13): 1901-1909.
- [48] Wang X F, Lazorchak A S, Song L, et al. Immune modulatory mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells through a trophoblast-like stage [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(2): 380-391.
- [49] Otsuji T G, Bin J, Yoshimura A, et al. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5): 734-745.
- [50] Yan L, Jiang B, Li E Q, et al. Scalable generation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells in 3D [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14(10): 1196-1210.
- [51] Wang X Y, Jiang B, Sun H Y, et al. Noninvasive application of mesenchymal stem cell spheres derived from hESC accelerates wound healing in a CXCL12-CXCR4 axis-dependent manner [J]. *Theranostics*, 2019, 9(21): 6112-6128.
- [52] Zhang J L, Xu W Q, Xiao Y T, et al. Accurate delivery of mesenchymal stem cell spheroids with platelet-rich fibrin shield: enhancing survival and repair functions of sp-mscs in diabetic wound healing [J]. *Advanced Science*, 2025, 12(25): e2413430.
- [53] Wu J J, Qin G H, Wang X Y, et al. Human ES cell-derived MSC spheroids encapsulated in polydopamine nanoparticle-modified GelMA hydrogel enhance diabetic wound healing [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2026, 24(1): 129.
- [54] Liu Y Y, Lü A, Wu J J, et al. Wound healing accelerated by stem cell bandage [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 517: 164346.
- [55] Yan L, Jiang B, Niu Y Y, et al. Intrathecal delivery of human ESC-derived mesenchymal stem cell spheres promotes recovery of a primate multiple sclerosis model [J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 4: 28.
- [56] Wang Z Y, Cheng S Y, Chen Y, et al. A comparative study of mesenchymal stem cell derived from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells through a trophoblast-like stage and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in treating acute xenogeneic graft-versus-host disease in humanized mice [J]. *Transplantation*, 2026, 110(8): e1649-e1656.
- [57] Bhang S H, Lee S, Shin J Y, et al. Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization [J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2012, 18(19/20): 2138-2147.
- [58] Amos P J, Kapur S K, Stapor P C, et al. Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery [J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2010, 16(5): 1595-1606.
- [59] Kouroupis D, Correa D. Increased mesenchymal stem cell functionalization in three-dimensional manufacturing settings for enhanced therapeutic applications [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 621748.
- [60] Jiang B, Yan L, Miao Z Q, et al. Spheroidal formation preserves human stem cells for prolonged time under ambient conditions for facile storage and transportation [J]. *Biomaterials*, 2017, 133: 275-286.
- [61] Jiang B, Fu X F, Yan L, et al. Transplantation of human ESC-de-

- rived mesenchymal stem cell spheroids ameliorates spontaneous osteoarthritis in rhesus macaques [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6587-6600.
- [62] 纳涛, 郝捷, 张可华, 等. 临床研究用人胚胎干细胞“种子细胞”的质量评价[J]. *生命科学*, 2016, 28(7): 731-742.
- Na T, Hao J, Zhang K H, et al. Quality assessment of ‘seed cells’ of human embryonic stem cells to be used in clinical studies [J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2016, 28(7): 731-742.
- [63] T/CSCB 0002—2020 人胚干细胞[S].
- [64] Rehakova D, Souralova T, Koutna I. Clinical-grade human pluripotent stem cells for cell therapy: characterization strategy [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2435.
- [65] Merkle F T, Ghosh S, Kamitaki N, et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations [J]. *Nature*, 2017, 545(7653): 229-233.
- [66] Närvä E, Autio R, Rahkonen N, et al. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(4): 371-377.
- [67] Xie X Y, Hiona A, Lee A S, et al. Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging [J]. *Stem Cells and Development*, 2011, 20(1): 127-138.
- [68] Catalina P, Montes R, Ligerio G, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? [J]. *Molecular Cancer*, 2008, 7: 76.
- [69] Josephson R, Sykes G, Liu Y, et al. A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines [J]. *BMC Biology*, 2006, 4: 28.
- [70] Tsai H H, Kao H J, Kuo M W, et al. Whole genomic analysis reveals atypical non-homologous off-target large structural variants induced by CRISPR-Cas9-mediated genome editing [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5183.
- [71] Kim J H, Jo H Y, Ha H Y, et al. Korea national stem cell bank [J]. *Stem Cell Research*, 2021, 53: 102270.
- [72] Petrus-reurer S, Kumar P, Padrell Sánchez S, et al. Preclinical safety studies of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells for the treatment of age-related macular degeneration [J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2020, 9(8): 936-953.
- [73] 国家食品药品监督管理总局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2017-12-18) [2026-09-17]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=452c529b299638297210fe4a1294eb31>.
- [74] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. (2015-08-21) [2026-09-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20150731120001226.html>.
- [75] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》的通告(2023年第33号)[EB/OL]. (2023-06-08) [2026-09-17]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfcaa7804aca84d648edb83b10c40b>.
- [76] T/CSCB 0003—2021 人间充质干细胞[S].
- [77] DB61/T 1497—2021 人间充质干细胞库建设与管理规范[S].
- [78] Samsonraj R M, Rai B, Sathiyathan P, et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1878-1891.
- [79] Krampera M, Galipeau J, Shi Y F, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(9): 1054-1061.
- [80] Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(10): 1019-1024.
- [81] Xu M J, Shaw G, Murphy M, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells are functionally and genetically different from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(6): 754-765.
- [82] Wang X F, Kimbrel E A, Ijichi K, et al. Human ESC-derived MSCs outperform bone marrow MSCs in the treatment of an EAE model of multiple sclerosis [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(1): 115-130.
- [83] Hwang N S, Varghese S, Lee H J, et al. *In vivo* commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20641-20646.
- [84] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则(试行)》的通告(2024年第6号)[EB/OL]. (2024-01-09) [2026-09-17]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/e3fad3babb1ee021494aaef0a93b14>.
- [85] Lai R C, Arslan F, Tan S S, et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, 48(6): 1215-1224.
- [86] Tan T T, Lai R C, Padmanabhan J, et al. Assessment of tumorigenic potential in mesenchymal-stromal-cell-derived small extracellular vesicles (MSC-sEV) [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(4), 345.
- [87] Yeung C K, Yan Y P, Yan L, et al. Preclinical safety evaluation and tracing of human mesenchymal stromal cell spheroids following intravenous injection into cynomolgus monkeys [J]. *Biomaterials*, 2022, 289: 121759.
- [88] Koltsova A M, Zenin V V, Yakovleva T K, et al. Characterization of a novel mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells [J]. *Cell and Tissue Biology*, 2016, 10(1): 1-9.
- [89] Xu J, Wang X F, Chen J Y, et al. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote colon epithelial integrity and regeneration by elevating circulating IGF-1 in colitis mice [J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12204-12222.
- [90] Mardpour S, Hassani S N, Mardpour S, et al. Extracellular vesicles derived from human embryonic stem cell-MSCs ameliorate cirrhosis in thioacetamide-induced chronic liver injury [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(12): 9330-9344.
- [91] Fu X, Chen Y, Xie F N, et al. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow [J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2015, 21(3/4): 616-626.
- [92] Vizoso F J, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative

- medicine [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(9): 1852.
- [93] Lotfinia M, Kadivar M, Piryaee A, et al. Effect of secreted molecules of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells on acute hepatic failure model [J]. *Stem Cells and Development*, 2016, 25(24): 1898-1908.
- [94] Rani S, Ryan A E, Griffin M D, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications [J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(5): 812-823.
- [95] Seyedrazizadeh S Z, Poosti S, Nazari A, et al. Extracellular vesicles derived from human ES-MSCs protect retinal ganglion cells and preserve retinal function in a rodent model of optic nerve injury [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, 11(1): 203.
- [96] Xu M, Feng T, Liu B W, et al. Engineered exosomes: desirable target-tracking characteristics for cerebrovascular and neurodegenerative disease therapies [J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8926-8944.
- [97] Feng J, He W, Xia J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal circDLGAP4 promotes angiogenesis after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating miR-320/KLF5 axis [J]. *The FASEB Journal*, 2023, 37(3): e22733.
- [98] Wu Q, Fu X L, Li X, et al. Modification of adipose mesenchymal stem cells-derived small extracellular vesicles with fibrin-targeting peptide CREKA for enhanced bone repair [J]. *Bioactive Materials*, 2023, 20: 208-220.
- [99] Hedayat M, Ahmadi M, Shoaran M, et al. Therapeutic application of mesenchymal stem cells derived exosomes in neurodegenerative diseases: a focus on non-coding RNAs cargo, drug delivery potential, perspective [J]. *Life Sciences*, 2023, 320: 121566.
- [100] Xin H Q, Liu Z W, Buller B, et al. MiR-17-92 enriched exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells enhance axon-myelin remodeling and motor electrophysiological recovery after stroke [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2021, 41(5): 1131-1144.
- [101] Xian P P, Hei Y, Wang R, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a nanotherapeutic agent for amelioration of inflammation-induced astrocyte alterations in mice [J]. *Theranostics*, 2019, 9(20): 5956-5975.
- [102] Kim J E, Ji Y E, Hwang H J, et al. Engineered MSC-EVs loaded with BDNF-enhancing neuropeptides via a non-disruptive method enhance post-stroke neuroregeneration via intranasal delivery [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 594.
- [103] He S Z, Wang Q Q, Chen L K, et al. miR-100a-5p-enriched exosomes derived from mesenchymal stem cells enhance the antioxidant effect in a Parkinson's disease model via regulation of Nox4/ROS/Nrf2 signaling [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 747.
- [104] English K, Barry F P, Field-Corbett C P, et al. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells [J]. *Immunology Letters*, 2007, 110(2): 91-100.
- [105] Sato K, Ozaki K, Oh I, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells [J]. *Blood*, 2007, 109(1): 228-234.
- [106] Shahsavari A, Weeratunga P, Ovchinnikov D A, et al. Pluripotency and immunomodulatory signatures of canine induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells are similar to harvested mesenchymal stromal cells [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 3486.
- [107] Dunn C M, Kameishi S, Cho Y K, et al. Interferon-gamma primed human clonal mesenchymal stromal cell sheets exhibit enhanced immunosuppressive function [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3738.
- [108] Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease [J]. *European Journal of Immunology*, 2008, 38(6): 1745-1755.
- [109] Summers B S, Thomas Broome S, Pang T W R, et al. A review of the evidence for tryptophan and the kynurenine pathway as a regulator of stem cell niches in health and disease [J]. *International Journal of Tryptophan Research*, 2024, 17: 11786469241248287.
- [110] Gonzalo-Gil E, Pérez-lorenzo M J, Galindo M, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells ameliorate collagen-induced arthritis by inducing host-derived indoleamine 2,3 dioxygenase [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2016, 18: 77.
- [111] Sans M, Panés J, Ardite E, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis [J]. *Gastroenterology*, 1999, 116(4): 874-883.
- [112] Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, et al. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier [J]. *European Journal of Immunology*, 2015, 45(4): 1043-1058.
- [113] Chaitanya G V, Cromer W, Wells S, et al. Metabolic modulation of cytokine-induced brain endothelial adhesion molecule expression [J]. *Microcirculation*, 2012, 19(2): 155-165.
- [114] Ge S J, Jiang X, Paul D, et al. Human ES-derived MSCs correct TNF- α -mediated alterations in a blood-brain barrier model [J]. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2019, 16(1): 18.
- [115] Cheng Z, Wang L P, Qu M J, et al. Mesenchymal stem cells attenuate blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia in mice [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 135.
- [116] van Grouw A, Colonna M B, Maughon T S, et al. Development of a robust consensus modeling approach for identifying cellular and media metabolites predictive of mesenchymal stromal cell potency [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(8): 792-808.