

曾贵荣,杨柳,罗桂芳,等. 间充质干细胞治疗的生物安全研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 140-145.

Zeng GR, Yang L, Luo GF, et al. Research progress on the biosafety of mesenchymal stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 140-145.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.023

间充质干细胞治疗的生物安全研究进展

曾贵荣, 杨 柳, 罗桂芳, 姜德建*

(湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331)

【摘要】 间充质干细胞是一群自我复制能力强、具有高度分化潜能的细胞, 来源广泛, 是细胞治疗的首要来源。在组织修复、自身免疫疾病和退行性疾病治疗中具有较高的价值。生物安全是间充质干细胞临床转化的主要障碍之一, 但目前缺乏足够的认识, 本文从间充质干细胞的遗传稳定性、致肿瘤发生、免疫原性方面阐述间充质干细胞的生物安全研究进展, 以期提高间充质干细胞治疗的生物安全意识, 为其间充质干细胞安全评价和临床转化提供参考。

【关键词】 间充质干细胞; 遗传稳定性; 致癌性; 免疫原性; 生物安全

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0140-06

Research progress on the biosafety of mesenchymal stem cells

ZENG Guirong, YANG Liu, LUO Guifang, JIANG Dejian*

(Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331)

【Abstract】 Mesenchymal stem cells (MSCs) possess the ability to self-renew and give rise to highly differentiated cell types, and can be isolated from a wide range of sources, making them the first choice for cell therapy. MSCs are widely used in tissue repair, autoimmune diseases and degenerative diseases, and have high value. Currently, biosafety is one of the most challenging problems in the clinical translation of MSCs. Previous research on the biosafety of MSCs has been largely unclear. Therefore, we reviewed the research progress on several aspects of MSC biosafety, including genetic stability, tumorigenicity and immunogenicity. This review may provide a reference for the safety evaluation and clinical transformation of MSCs.

【Keywords】 mesenchymal stem cells; genetic stability; tumorigenicity; immunogenicity; biosafety

近年来,随着老龄化社会的加快,骨质疏松症、神经退行性疾病、糖尿病等与年龄相关的疾病发病率逐年攀升,给医学和生命科学带来了巨大挑战,目前以化学药物和手术治疗为支柱的传统西医治疗逐渐遭遇瓶颈,而以干细胞技术为核心的再生医学快速发展并走上临床应用,为人类衰老性疾病治

疗注入了新的希望和活力^[1-7]。据 ClinicalTrials.gov 统计,全球 210 多项间充质干细胞处于临床研究^[8], 主要集中于伤口愈合,骨骼肌、心血管、肝肾疾病、肿瘤、神经退行性疾病和自身免疫性疾病以及器官移植等。然而间充质干细胞的生物安全限制了其临床的应用,主要表现在人体内的间充质干细胞较

【基金项目】 湖南省科技计划(2016TP1026)。

【作者简介】 曾贵荣(1978—),男,博士,副研究员,研究方向:新药药理毒理学。E-mail: zengguirong@hnse.org

【通信作者】 姜德建(1979—),男,博士,研究员,研究方向:新药药理毒理学。E-mail: jiangdejian@hnse.org

少,无法分离后直接输入体内用于细胞治疗^[9],且临床治疗需要满足以下条件^[10]:充足的细胞量,分化成特定的细胞,输注后受体中细胞存活且有效,移植后对受体安全。相应地,细胞治疗包括供体选择、间充质干细胞分离、培养扩增、临床前、临床疗效和安全性评价、移植等过程^[11],其中任何一个环节存在问题都将影响治疗的安全和疗效。作为一种新的治疗形式,间充质干细胞生物安全是细胞治疗能否进入临床应用,保障患者生活质量的关键问题。因此系统的综述目前间充质干细胞生物安全有助于促进间充质干细胞治疗的发展与应用。本综述从间充质干细胞遗传稳定性、致癌性、免疫原性等方面阐述间充质干细胞治疗的生物安全研究进展,为降低间充质干细胞治疗风险提供参考。

1 干细胞及间充质干细胞概述

干细胞是一种未完全分化的、具有自我增殖和高度分化潜能的细胞。根据来源和分化增殖能力不同,将干细胞分成多能胚胎干细胞、人诱导多能干细胞和多能成体干细胞等三大主要细胞类型^[1]。干细胞具有非常强的分化能力,在特定条件下可被分化成神经元、心肌细胞、肝细胞、成骨细胞等多种细胞,移植进入机体可替换损伤组织或产生修复因子促进组织再生^[2],干细胞的分化能力极大地推动了再生医学的发展和退行性疾病的治疗,具有传统化学药物、生物药物不具备的优势。

间充质干细胞是一种来源于中胚层具有自我复制更新和多向分化的多能干细胞,具有独特的免疫表型和免疫调节能力,属于多能成体干细胞。相对于多能胚胎干细胞、人诱导性多能干细胞,它的分化和增殖能力较弱^[3]。自上世纪六七十年代,Friedenstein 研究组首次发现一群位于动物骨髓细胞中的边缘细胞群具有成骨能力,起初被定义为贴壁集落形成单元成纤维细胞^[4]。因这群细胞可生成骨骼组织相关的细胞,被认为是干细胞,也有称为造血干细胞或间质细胞体外培养的饲养细胞。基于细胞的功能演化成成骨干细胞或骨髓间质细胞。此外,这一细胞在包括人类在内的其他物种中得以证实。随后,为适应起源于胚胎中胚层细胞的概念,Caplan 等^[5]首次提出“成年间充质干细胞”这一概念,并被科学家和临床医生广泛应用。

间充质干细胞来源于多种人体组织,最主要的来源为骨髓和脂肪组织^[1]。也可从脐带血、胎盘、

羊膜、牙髓、脑、子宫内膜、皮肤、鼻粘膜等组织分离获得间充质干细胞。它不仅可直接分化成组织特异性细胞修复伤口而且可通过释放抗炎细胞因子、抗凋亡和生长因子的旁分泌的形式刺激组织修复,被认为是组织工程和再生医学的强有力工具^[6-7]。此外,间充质干细胞可在炎症、肿瘤和损伤部位归巢替代或修复损伤的组织^[1]。基于其独特优势,间充质干细胞是细胞治疗的理想候选物,在组织再生、癌症、骨关节病等方面具有广阔的前景。

2 遗传稳定性及其影响因素

欧洲药品监督管理局出台的《关于干细胞的医疗产品的反思报告》对细胞治疗产品无污染、活力、生长曲线、细胞鉴定、纯度、效力和遗传稳定性做了详细的管理规定,特别强调遗传稳定性是主要的安全担忧^[12]。遗传稳定性指标表现为染色体畸变、微核异常、DNA 损伤、端粒缩短、表观遗传失调等。遗传不稳定与癌变密切相关,染色体核型分析是评价细胞染色体结构和数量的金标准^[13]。干细胞扩增可降低 DNA 聚合酶和 DNA 修复效能进而导致细胞遗传突变、表观遗传学改变、DNA 双链断裂^[14-15]。而 DNA 损伤阻滞转录和复制驱动细胞衰老及转分化失常,进一步加剧组织老化和年龄相关的癌变^[16-17]。

遗传稳定性受供体、组织来源、扩增过程培养条件、储存条件、传代次数等影响^[18]。Stultz 等^[19]对不同供体和代数的骨髓源性人间充质干细胞的染色体稳定性分析显示,相比于第 5、7 代,第 3 代异常核型更多,且随着代数增加,异常核型逐渐降低。根据供体年龄不同分成老年组(39~41 岁)和年轻组(22~31 岁),发现老年组供体主要为染色体易位,而年轻组为非整倍体,但老年组与年轻组的染色体并无显著差异,提示间充质干细胞染色体异常主要发生在早期代数,随着传代次数越多,染色体越趋于成熟稳定。Duarte 等^[20]比较了低温保存前后对人脐静脉间充质干细胞的染色体状态的影响,发现液氮冻存后检测到非克隆型染色体畸变,17 个细胞中期中 12 个细胞显示单体性(2 个标记染色体,其他为染色体断裂),5 个细胞染色体的结构发生改变。冻存 2 个月的细胞染色体 3 短臂臂内发生倒位。Sharma 等^[21]评价了高糖、缺血、缺氧、饥饿等不同培养条件下人脐带和胎盘来源的间充质干细胞遗传稳定性,发现突然降低氧浓度可增加核泡

数量,减少细胞增殖,但未诱导衰老;而在高糖、缺血以及低氧血清饥饿下间充质干细胞遗传保持稳定。Vinogradov 等^[22]采用热休克模拟高温环境下人子宫内膜间充质干细胞的分子遗传特征,G 带显示染色体随机断裂和非整倍体;染色体核型分析观察到细胞无基因组不平衡现象;mRNA 测序数据显示,与对照组相比,热休克诱导错配,破坏 DNA 修复。人间充质干细胞暴露在 20% O₂ 下培养显著增加氧化应激水平,诱导 DNA 双链断裂、染色体畸变、非整倍体以及端粒缩短;而 3% O₂ 的条件下培养干细胞的寿命延长,遗传稳定性显著增加;利用原位杂交分析人脂肪组织来源间充质干细胞的染色体 8、11、17,发现低氧降低非整倍体发生率;表明低氧条件有助于增强人间充质干细胞治疗的安全性^[23]。

综上所述,间充质干细胞遗传稳定性直接影响细胞的衰老、转分化进而可引起衰老和癌变,是干细胞治疗中的主要安全问题。其遗传稳定性主要受到扩增传代次数、培养条件、保存环境的影响,深入研究影响间充质干细胞的遗传稳定性机制,调整细胞培养条件并建立细胞产品制备的标准操作规程,有利于提高细胞遗传稳定性,保障细胞治疗安全。

3 致癌特性及其影响因素

致肿瘤发生是间充质干细胞临床治疗最重要风险之一。由于间充质干细胞本身的自我更新和分化潜能,长期培养能自发性转化成其他细胞,大多数可分化成成骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、脂肪细胞等无害细胞,也可能分化成恶性细胞^[24-25],这是间充质干细胞的固有特性。前期研究显示,癌症细胞的起源和恶变与间充质干细胞特征相似,如长期的增殖、生长调控机制^[26]。事实上,在一项将大量未分化的人胚胎干细胞移植到免疫缺陷小鼠观察到畸胎瘤生长的研究报道后^[27],干细胞的致癌风险被推向了风口浪尖,给干细胞快速发展浇上了一盆冷水,警醒企业、临床和科学界关注干细胞治疗的生物安全问题。尽管迄今未见间充质干细胞形成畸胎瘤的报道,但由于它具有自我增殖、分化等与干细胞相同的特性,其致癌发生风险仍不能忽视。

干细胞的致肿瘤发生受到环境因素影响,如遗传操作和体外培养。文献报道,长时间培养的间充质干细胞具有致瘤发生的潜能,转化成为高核质比、高端粒活性和高增值能力的上皮样细胞^[28-29]。

此外,遗传不稳定性与肿瘤发生密切相关^[30],如在高氧可诱导染色体畸变、DNA 损伤。Conforti 等研究^[31]了电离辐射和饥饿应激下骨髓间充质干细胞的恶变情况,发现辐射和饥饿的间充质干细胞失去了典型的纺锤形形态、生长速率降低,但保持了正常的免疫和分化功能,更为重要的是未表现出恶性癌变倾向。Yong 等^[32]评估了长期保存人脂肪来源的间充质干细胞的致瘤发生变化,发现利用低温细胞保护剂冷冻保存 3 个月细胞的肿瘤抑制因子 p53、p21、p16、pRb、hTERT、端粒酶活性和端粒长度未见明显变化,DNA 损伤和 p53 突变无显著影响,表明长期保存脂肪来源的间充质干细胞发生肿瘤风险较低。给小鼠注射脂肪组织间充质干细胞 1 年后显示,移植细胞被完全清除,未见肿瘤发生^[33]。然而,研究发现将间充质干细胞移植到 SCID 小鼠中,观察到肿瘤的生长现象^[29]。椎管内内嗅粘液细胞自体移植 8 年后,一位年轻的脊髓损伤患者出现自体移植植物来源的脊髓肿块,肿块组织学与嗅黏膜相似^[34]。2009 年,文献报道一例胎儿神经干细胞移植治疗共济失调毛细血管扩张 4 年后发生胶质神经瘤,基因分析显示肿瘤细胞来源于供体^[35]。

综上所述,间充质干细胞自身固有特性和培养环境是致瘤性的决定因素。肿瘤发生与免疫缺陷相关,由于间充质干细胞具有免疫抑制的作用,故间充质干细胞可能调控免疫促进肿瘤发生。尽管现有研究提示间充质干细胞移植的致瘤风险较低,但在间充质干细胞临床应用前,仍需严格评估其致瘤发生潜在影响。

4 免疫原性及其影响因素

干细胞从健康志愿者分离获得(同种异体),也可从患者自身分选制备。在同种异体干细胞移植面临伦理问题和免疫排异反应^[36]。人间充质干细胞具有免疫调节作用^[37],当机体免疫过低时,间充质干细胞能促进炎症。相反,免疫过度激活时,间充质干细胞抑制炎症进而避免自身攻击。因此,有观点认为间充质干细胞具有免疫特权,移植时可能不会诱发免疫反应^[38]。

间充质干细胞通过以下途径发挥免疫调控作用:通过抑制分裂素、异种抗原的 T 淋巴细胞增殖反应,诱导初始 T 细胞无能,抑制调节性 T 细胞扩增,抑制对同种异体细胞的 T 淋巴细胞毒性从而抑制 T 淋巴细胞功能;它还可通过抑制自然杀伤细胞

对病毒感染细胞的杀伤作用,抑制 IL-2 驱动 NK 细胞增殖和 INF- γ 释放;此外,间充质干细胞也可下调树突细胞共刺激分子表达,抑制单核细胞和 CD34⁺ 祖细胞分化成树突细胞,降低促炎细胞因子 IL-12、INF- γ 、TNF- α 的释放而增加 IL-10 分泌。间充质干细胞可作为抗原呈递细胞将 HLA-I 限制性病毒或肿瘤抗原加工呈递给 CD4⁺T 细胞,释放少量的 INF- γ 和颗粒酶 B,但其 T 淋巴细胞杀伤毒性效果非常有限^[39]。Klyushnenkova 等^[40]评估了骨髓间充质干细胞激活同种异体 T 细胞能力,发现异体骨髓间充质干细胞无法促进外周血 T 淋巴细胞增殖,但可释放 INF- γ 。将间充质干细胞加入初始混合淋巴细胞共同培养观察到间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖,且抑制效果呈现剂量依赖性,其发生与是否进行 INF- γ 预处理无关,表明间充质干细胞开始可激活异体 T 细胞,但由于其免疫抑制作用无法引起 T 细胞增殖反应。以上均提示同种异体间充质干细胞具有免疫抑制作用且较低的免疫原性。

Deuse 等^[41]比较了人脐带间充质干细胞和成年骨髓间充质干细胞的免疫原性,结果显示人脐带间充质干细胞 HLA-I 表达更低,TGF- β 和 IL-10 生成更多,增殖更快。骨髓间充质干细胞对异体淋巴细胞激活和体内免疫活化能力更强,而人脐带间充质干细胞免疫识别能力更弱。骨髓间充质干细胞在完全免疫小鼠显示更快的排异反应。最近的一项研究发现同种异体间充质干细胞移植后产生了抗体和显著的免疫排异反应^[42]。体外研究显示,大鼠间充质干细胞对异体 T 细胞无法激活,而 INF- γ 和 IL-1 β 处理后,间充质干细胞上调 MHC I、II 和血管粘附分子-1,增加 T 淋巴细胞毒性反应。接受间充质干细胞异体移植的大鼠的免疫活化标志物 CD25、CD71 显著上调,生成同种抗体促进补体介导的细胞裂解作用^[43]。Huang 等^[44]研究了间充质干细胞分化对细胞免疫的影响,发现间充质干细胞分化成的肌源性细胞、内皮细胞和平滑肌细胞组织相容性复合体 I a、II 表达增加, I b 则降低。这些细胞与异体白血球共培养后细胞毒性显著增加。采用分化的细胞处理心肌梗死大鼠,检测心肌功能 6 个月,发现移植 3 个月后,间充质干细胞显著改善心室功能。而异体分化的细胞在移植后 5 周被完全清除,移植 5 个月后其疗效丧失,表明间充质干细胞分化后免疫激活排斥功能增加。Liu 等^[45]将骨髓间充质干细胞分化的成骨细胞与异体淋巴细胞共培养

显示淋巴增殖反应,接受成骨细胞移植的新西兰白兔表现出明显的皮肤排异反应,该研究同样证实了间充质干细胞分化成特定细胞可产生显著的免疫排斥反应。

综上,间充质干细胞具有免疫抑制作用,但不具有免疫特权。间充质干细胞异体移植需注意免疫排异反应,且其免疫排斥反应与其组织来源、分化状态密切相关。

5 结语

间充质干细胞具有自我增殖、分化潜能、免疫调控功能,是细胞治疗的理想材料,在发育和再生医学中表现光明的前景。在间充质干细胞治疗的发展过程中,其生物安全(遗传不稳定、致肿瘤发生、免疫排异反应等)会直接影响其临床转化和应用,已成为制约其产业发展的主要障碍。为了推动干细胞产业迅速发展,国内外相关部门做出了许多努力,但目前对间充质干细胞的制备及其生物安全的研究国内外尚未形成统一的标准和体系,国家知识产权局甚至将干细胞与再生医学、免疫治疗等明确列为急需知识产权支持和国家重点发展的产业之一。在间充质干细胞应用前,需根据《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》的质量控制标准、《中华人民共和国药典》、ISCT-间充质干细胞鉴定标准(2006),对生物安全风险因素,如微生物、内毒素、致瘤性、异常毒性、残留性、核型异常率进行检测,且国际细胞治疗协会也制定了间充质干细胞应用于临床试验的放行标准,根据以上原则来降低干细胞应用的生物安全风险。未来需要深入研究间充质干细胞遗传不稳定、致癌、免疫排异的发生机制,对间充质干细胞产品制备和临床治疗进行严格规范和标准化,建立质量控制和安全评估标准体系,和准则,消除存在的安全隐患,保障人类安全。

参考文献:

- [1] Neri S. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: A fundamental biosafety aspect [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2406.
- [2] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation [J]. Transpl Immunol, 2005, 15(2): 81-89.
- [3] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells [J]. Stem cells, 2014, 32(6): 1408-1419.
- [4] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of

- guinea-pig bone marrow and spleen cells [J]. Cell Tissue Kinet, 1970, 3(4): 393-403.
- [5] Caplan AI. Mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641-650.
- [6] von Bahr L, Batsis I, Moll G, et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation [J]. Stem cells, 2012, 30(7): 1575-1578.
- [7] Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 11(6): 221.
- [8] Singh RK, Occelli LM, Binette F, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in the subretinal space of the cat eye [J]. Stem Cells, 2019, 28(17): 1151-1166.
- [9] Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells; current state of the art [J]. Cell Regen, 2015, 4: 7.
- [10] Gimble JM, Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics [J]. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(5): 705-713.
- [11] Yong KW, Choi JR, Dolbashid AS. Biosafety and bioefficacy assessment of human mesenchymal stem cells: what do we know so far? [J]. Regen Med, 2018, 13(2): 219-232.
- [12] EMEA, Committee for Advanced Therapies (CAT). Reflection paper on stem cell-based medicinal products [S]. London: EMA, 2011: 1-4.
- [13] Dittmar KE, Simann M, Zghoul N, et al. Quality of cell products: Authenticity, identity, genomic stability and status of differentiation [J]. Transfus Med Hemother, 2010, 37(2): 57-64.
- [14] Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during *in vitro* expansion [J]. Stem cells, 2007, 25(9): 2371-2382.
- [15] Neri S, Pawelec G, Facchini A, et al. Microsatellite instability and compromised mismatch repair gene expression during *in vitro* passaging of monoclonal human T lymphocytes [J]. Rejuvenation Res, 2007, 10(2): 145-156.
- [16] Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(9): 579-590.
- [17] Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process [J]. Blood, 2018, 131(5): 488-495.
- [18] Sensebe L, Tarte K, Galipeau J, et al. Therapy MSCotISfC Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells [J]. Cell stem cell, 2012, 10(1): 9-10.
- [19] Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, et al. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during *in vitro* culture [J]. Cytotherapy, 2016, 18(3): 336-343.
- [20] Duarte DM, Cornelio DA, Corado C, et al. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein [J]. Regen Med, 2012, 7(2): 147-157.
- [21] Sharma S, Bhonde R. Mesenchymal stromal cells are genetically stable under a hostile *in vivo*-like scenario as revealed by *in vitro* micronucleus test [J]. Cytotherapy, 2015, 17(10): 1384-1395.
- [22] Vinogradov AE, Shilina MA, Anatskaya OV, et al. Molecular Genetic analysis of human endometrial mesenchymal stem cells that survived sublethal heat shock [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 2362630.
- [23] Estrada JC, Albo C, Benguria A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(5): 743-755.
- [24] Lowe T, Bhatia S, Somlo G. Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(10): 1121-1134.
- [25] Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination; putting the research field on track-letter [J]. Cancer Res, 2010, 70(15): 6393-6396.
- [26] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 3035-3039.
- [27] Gropp M, Shilo V, Vainer G, et al. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny [J]. PloS One, 2012, 7(9): e45532.
- [28] Pan Q, Fouraschen SM, Ruiter PE, et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(1): 105-115.
- [29] Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation [J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5331-5339.
- [30] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [31] Conforti A, Stare N, Biagini S, et al. Resistance to neoplastic transformation of ex-vivo expanded human mesenchymal stromal cells after exposure to supramaximal physical and chemical stress [J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77416-77429.
- [32] Yong KW, Safwani W, Xu F, et al. Assessment of tumorigenic potential in long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(8): 2217-2226.
- [33] MacIsaac ZM, Shang H, Agrawal H, et al. Long-term *in vivo* tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(4): 416-423.
- [34] Dlouhy BJ, Awe O, Rao RC, et al. Autograft-derived spinal

- cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient: Case report [J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21(4): 618–622.
- [35] Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient [J]. *PLoS Med*, 2009, 6(2): e1000029.
- [36] Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1): 1–15.
- [37] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2019, 53(1): e12712.
- [38] Xian B, Huang B. The immune response of stem cells in subretinal transplantation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 161.
- [39] Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens [J]. *Stem cells*, 2008, 26(5): 1275–1287.
- [40] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells; immunogenicity, tolerance, and suppression [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 12(1): 47–57.
- [41] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(5): 655–667.
- [42] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells; immune evasive, not immune privileged [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 252–260.
- [43] Schu S, Nosov M, O'Flynn L, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 2094–2103.
- [44] Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair [J]. *Circulation*, 2010, 122(23): 2419–2429.
- [45] Liu H, Kemeny DM, Heng BC, et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2864–2871.

〔收稿日期〕2020-03-15

(上接第 139 页)

- [51] Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, et al. Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 856–860.
- [52] Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease [J]. *Nature*, 2005, 437(7056): 270–274.
- [53] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(6): 828–834.
- [54] Kruzynska-Freitag A, Machnicki M, Rogers R, et al. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation [J]. *Mech Dev*, 2001, 103(1–2): 183–188.
- [55] Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, et al. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease [J]. *Physiol Genomics*, 2009, 39(3): 160–168.
- [56] Chen B, Bronson RT, Klamann LD, et al. Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 296–299.
- [57] Weiss RM, Chu Y, Brooks RM, et al. Discovery of an experimental model of unicuspid aortic valve [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(13): e006908.
- [58] Fealey ME, Edwards WD, Miller DV, et al. Unicommissural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978–2008) [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(4): 324–333.
- [59] Li C, Xu S, Gotlieb AI. The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(3): 183–190.
- [60] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(2): 270–278.
- [61] Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847–856.

〔收稿日期〕2020-03-30