

叶志超, 陈国玉, 潘若浪, 等. 人脐带间充质干细胞单次静脉注射 NOG 小鼠组织分布及其分析方法学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1573-1580.

Ye ZC, Chen GY, Pan RL, et al. Tissue distribution and analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in NOG mice following single intravenous injection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1573-1580.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.007

人脐带间充质干细胞单次静脉注射 NOG 小鼠组织分布及其分析方法学研究

叶志超^{1#}, 陈国玉^{1#}, 潘若浪², 史煜华¹, 顾利强¹, 夏丽娟¹,
林晓波¹, 张强², 徐莎莎², 邵金金^{1*}, 张立将^{1*}

(1. 杭州医学院安全性评价研究中心, 浙江省药物安全性评价技术研究
重点实验室, 杭州 310053; 2. 杭州易文赛生物技术有限公司, 杭州 311100)

【摘要】 目的 建立并验证小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学, 研究人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)单次静脉注射后在重度免疫缺陷 NOG 小鼠体内的组织分布情况。**方法** 建立小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法, 进行标准曲线与线性范围、准确度与精密度、稳定性等方法学验证。取 NOG 小鼠 36 只, 雌雄各半, 单次静脉注射给予 HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg, 于 6、12、24、72 h、1 周、2 周各取 6 只小鼠麻醉, 采集血液(EDTA 抗凝)后解剖, 取肺、肾、心脏、肝、大脑、脊髓、胃、小肠、脂肪、皮肤、脾、睾丸(子宫、卵巢)提取 DNA, 用已验证的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法测定各组织中 HUCMSCs 的分布情况。另选取 NOG 小鼠 18 只, 雌雄各半, 分为对照组 6 只、给药组 12 只, 分别静脉注射 0.9%氯化钠注射液、HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg, 给药期间观察小鼠急性毒性反应情况, 给药组于给药后 72 h、2、4 周各取 4 只动物剖检观察脏器组织大体观情况, 取肺组织石蜡切片采用免疫组化法检测线粒体蛋白表达, 分析 HUCMSCs 在肺组织中的定植情况。**结果** 建立的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法各考察指标均符合验证标准; NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后, 主要分布于肺和血液中(给药后 1 周内), 肺组织浓度高于血液, 肺组织、血液中 HUCMSCs 浓度分别在 6 ~ 24 h、6 ~ 72 h 之内维持相对平稳水平, 之后随时间推移下降, 其他组织各采样点均未测得 HUCMSCs 分布; 定植结果显示静脉注射 HUCMSCs 后 72 h 可在肺部检测到其存在, 2 周和 4 周时则未检测到; 单次静脉注射 HUCMSCs 后 NOG 小鼠未见明显急性毒性反应。**结论** 建立的 HUCMSCs 小鼠组织中分布分析方法可靠、可行; NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后主要于给药后 1 周内分布于肺和血液, 72 h 主要定植于肺组织; 单次静脉注射 HUCMSCs 具有良好的安全性。

【关键词】 人脐带间充质干细胞; NOG 小鼠; 定植分析; 组织分布

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1573-08

Tissue distribution and analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in NOG mice following single intravenous injection

YE Zhichao^{1#}, CHEN Guoyu^{1#}, PAN Ruolang², SHI Yuhua¹, GU Liqiang¹, XIA Lijuan¹,
LIN Xiaobo¹, ZHANG Qiang², XU Shasha², SHAO Jinjin^{1*}, ZHANG Lijiang^{1*}

【基金项目】 浙江省重点研发计划项目(2021C03077), 杭州医学院青年科研基金项目(KYQN202106)。
Funded by Key R&D Program of Zhejiang Province (2021C03077), Hangzhou Medical College Youth Research Fund Project (KYQN202106).
【作者简介】 叶志超(1997—), 硕士, 研究方向: 药理学。Email: 1390725525@qq.com;
陈国玉(1997—), 硕士, 研究方向: 药理学。Email: chenguoyuuu@163.com。
#共同第一作者
【通信作者】 张立将(1981—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 药理毒理学研究。Email: 2020000087@hmc.edu.cn;
邵金金(1989—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 药理毒理学研究。Email: shaojinjin@hmc.edu.cn。
* 共同通信作者

(1. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Center of Safety Evaluation and Research, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China. 2. S-Evans Biosciences Co., Ltd, Hangzhou 311100)
Corresponding author: ZHANG Lijiang. E-mail: 2020000087@hmc.edu.cn; SHAO Jinjin. E-mail: shaojinjin@hmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for the analysis of human-derived SRY DNA in mouse tissues, and to study the tissue distribution of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) in immunodeficient NOG mice after a single intravenous injection. **Methods** We established a quantitative PCR method for the analysis of human SRY DNA in mouse tissues, and validated the standard curve, linear range, accuracy, precision, and stability. Thirty-six NOG mice (18 male, 18 female) were administered 3.5×10^7 HUCMSCs/kg by single intravenous injection. Six mice were then anesthetized and dissected after blood collection (EDTA anticoagulation) at 6, 12, 24, and 72 h, and at 1 and 2 weeks, respectively. DNA was extracted from lung, kidney, heart, liver, brain, spinal cord, stomach, small intestine, fat, skin, spleen, testis, uterus, and ovary tissues, and the distribution of HUCMSCs in each tissue was determined by the validated quantitative PCR method for detecting the human-derived SRY gene in mouse tissues. In addition, 18 NOG mice (9 male, 9 female) were divided into control ($n = 6$) and treatment groups ($n = 12$) injected intravenously with 0.9% sodium chloride and 3.5×10^7 cells/kg, respectively. Acute toxic reactions were observed during the administration period, and four animals were dissected at 72 h and at 2 and 4 weeks after administration to observe the gross organs. Mitochondrial protein expression was detected in paraffin sections of lung tissues by immunohistochemistry to analyze the colonization of HUCMSCs in lung tissues. **Results** The established RT-qPCR method for human-derived SRY DNA in mouse tissues met the validation criteria for each index. After a single intravenous injection in NOG mice, HUCMSCs were mainly distributed in the lungs and blood within 1 week after administration, with higher concentrations in lung tissues than in blood. The concentrations of HUCMSCs in lung tissue and blood remained relatively stable within 6 ~ 24 h and 6 ~ 72 h, respectively, and then decreased over time. The distribution of HUCMSCs in other tissues was not measured at all sampling points. The colonization result showed that HUCMSCs were detected in lungs 72 h after intravenous injection, but not at 2 and 4 weeks. No obvious acute toxicity was observed in NOG mice after single intravenous administration of HUCMSCs. **Conclusions** The above method for analyzing the distribution of HUCMSCs in mouse tissue is reliable and feasible. HUCMSCs were mainly distributed in lung and blood in NOG mice within 1 week after a single intravenous injection, and mainly colonized lung tissue at 72 h. A single intravenous administration of HUCMSCs has a good safety profile.

【Keywords】 human umbilical cord mesenchymal stem cells; NOG mouse; colonization analysis; tissue distribution
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来受新型冠状病毒影响,急性肺损伤发病率急剧增加^[1-2],严重感染时死亡率可高达 40%,目前主要治疗手段仅以支持治疗为主,急需寻找更为安全有效的治疗手段^[3-4]。已有研究表明,间充质干细胞具有非常可观地促进损伤组织再生修复和免疫调节作用,这使得间充质干细胞成为治疗急性肺损伤的“救命稻草”^[5]。间充质干细胞是一类具有多向分化和自我更新潜能的未分化细胞^[6-7],在组织修复及免疫调节等方面有巨大的应用潜力和价值。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)是一类人脐带中胚层来源的成体干细胞^[8],具有可塑性强、免疫原性低和排异少等优点,同时还拥有易于分离培养、分泌多种细胞因子以及调节免疫等诸多优点^[9],目前临床主要拟用于造血支持,免疫系统疾病、心血

管系统疾病以及代谢疾病等多种疾病类型^[10-12]。虽然间充质干细胞已经被一些国家批准上市,但仍有很多人对其组织分布情况及安全性问题充满疑虑。

有研究表明间充质干细胞治疗(95%为脐带 MSC)后出现急性反应的占 11.9%^[13],包括发烧、头痛、心悸、脸部充血和失眠等症状。临床拟静脉注射 HUCMSCs 用于治疗急性肺损伤,应先考虑 HUCMSCs 输注后的急性毒性反应及体内分布情况。但目前受检测技术限制,缺乏标准化的人源 MSCs 体内检测方法,尚无法准确获得 HUCMSCs 在体内的组织分布状态及代谢情况。SRY 基因是雄性性别决定基因,指 Y 染色体上具体决定生物雄性性别的基因片段。SRY 在胚胎发育早期决定性别的分化和睾丸的形成。人的 SRY 基因位于 Yp11.3,编

码一个 204 氨基酸的蛋白质^[14-15]。为研究干细胞移植后的体内代谢情况,可选择将人源男性胚胎脐带间充质干细胞静脉注射移植到 NOG 小鼠中,通过检测小鼠组织样本中男性 SRY 基因的丰度和比例来对间充质干细胞的体内代谢情况进行动态检测。本研究建立了小鼠组织中 HUCMSCs(人源 SRY 基因 DNA)的 RT-qPCR 分析方法,考察重度免疫缺陷小鼠(NOG 小鼠)单次静脉注射 HUCMSCs 后的急性毒性反应、探索可能的毒性靶器官,以及体内组织分布、定植情况,为后续临床用药提供剂量参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

54 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级健康 NOG 小鼠,雌雄各半,雌鼠体重 13.8 ~ 20.2 g,雄鼠体重 20.3 ~ 23.5 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。动物房温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,中央空调集中通风每小时不低于 15 次,光照 12 h 明、12 h 暗,IVC 换气次数为每小时 30 ~ 80 次,饲养于杭州医学院安全性评价研究中心屏障环境动物房内的独立送回风净化笼具(IVC)中【SYXK(浙)2022-0027】,经兽医检疫合格后使用。本研究过程中用到的实验动物饲养及使用均以科研为目的,可能涉及的与实验动物使用及福利相关的内容和程序都遵从实验动物使用和管理相关的法律法规和杭州医学院安全性评价研究中心实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)的相关规定(NGLP-2020-019,NGLP-2021-004)。

1.1.2 细胞及细胞稀释液

人脐带间充质干细胞由杭州易文赛生物技术有限公司提供(符合质量检测标准),2 ~ 8℃短期保存于杭州易文赛生物技术有限公司提供的细胞稀释液中。

1.1.3 主要试剂与仪器

SRY-F 引物 5'-TGTCGCACTCTCCTTGTTT TT-3'和 SRY-R 引物 5'-TGGGTCGCTTCACTCTA TCCT-3'(生物工程(上海)股份有限公司);Power UpTM SYBRTM Green Master Mix (A25742, Thermo Fisher Scientific);SRY 质粒(浙江易思得生物科技有限公司);Nuclease-free H₂O (200019A,可帮基因);DNA 提取试剂盒(S8030/S8031,天根生化科技

(北京)有限公司)。RT-qPCR 仪(Step One Plus, Applied Biosystems);微量台式离心机(Heraeus Pico 17, Thermo Fisher);漩涡震荡仪(VORTEX-GENIE 1,Scientific Industries);超微量紫外分光光度计(ND-ONE-W,Thermo Fisher)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠组织中 HUCMSCs 人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法学研究

建立小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法,取贴壁培养的 HUCMSCs 和雌性小鼠各器官组织提取 DNA 并检测其浓度,在 RT-qPCR 仪上按表 1 配制反应液,引物序列见表 2,参数设置为 50℃ 2 min;95℃ 2 min;95℃ 15 s,64℃ 1 min,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。

表 1 反应液配制

Table 1 Preparation of reaction solution		
试剂名称 Reagents name	体积(μL) Volume(μL)	
Nuclease-free H ₂ O	8.0	
Power Up TM SYBR TM Green Master Mix	10.0	
10 μmol/L SRY-F	0.5	
10 μmol/L SRY-R	0.5	
Sample	1.0	
总体积 Total	20.0	

选择性验证方法:取稀释液(Buffer TE)、预混液、空白基质、干细胞 DNA 样品、空白基质添加标准品,按照样品处理方法处理和测定,稀释液 TE、预混液和空白基质没有响应或对测定无干扰测得结果为 Undetermined 或出现的 Ct 值符合接受标准。

标准曲线和线性范围验证方法:制备零浓度样品及浓度分别为 1.00 × 10²、2.00 × 10²、2.00 × 10³、5.00 × 10⁴、2.00 × 10⁵、1.00 × 10⁶、8.00 × 10⁶、1.00 × 10⁷ copies/μL 校正标样。将校正标样浓度的 LOG 值与复孔 Ct 平均值作回归分析,计算标准曲线。然后将校正标样的 Ct 值代入相应标准曲线,计算回算浓度和回算准确度。接受标准:回算准确度应在 55% ~ 145%,定量下限处应在 50% ~ 150%。

准确度和精密度验证方法:制备 SRY 质粒浓度为 1.00 × 10²、3.00 × 10²、1.00 × 10⁴、7.50 × 10⁶、1.00 × 10⁷ copies/μL 的质控样品,各取 5 μL,加入 45 μL 空白基质,涡旋混匀,将 Ct 值代入当日标准曲线,计算实测浓度。接受标准:准确度实测浓度与标称浓度的比值均值应在 55% ~ 145%,定量下限准确度应在 50% ~ 150%;精密度实测浓度间的

相对标准偏差 (RSD) 不得超过 45%, 定量下限的精密密度不得超过 50%。

提取 DNA 组样品稳定性验证方法: 空白组织样品进行 DNA 提取后进行分装, 分别于处理测定 (0 h)、冻融 3 次、-80℃ 长期冻存 (18、41 和 84 d) 条件下放置后, 在 260 nm 测得浓度值, 计算每组样本浓度均值与零时样品的偏差。接受标准: 样本浓

度与 0 时测定结果相比偏差在 ± 15% 以内。

样品稳定性验证方法: 取质控液用空白基质稀释至低浓度 (3.00×10^2 copies/μL) 和高浓度 (7.50×10^6 copies/μL), 然后对这些样品进行分装, 冻融 3 次, -80℃ 长期保存 (7、15、30 和 68 d) 后, 获取分析物的浓度。接受标准: 每一浓度的均值与标示浓度相比偏差应在 ± 45% 范围内。

表 2 选择性结果
Table 2 Selective result

样品类型 Sample type	稀释液 Diluent TE	空白基质 Blank matrix	预混液 Premix	男性干细胞 DNA 样品 Stem cell DNA samples for men	LLOQ 选择性样本 LLOQ level of selective sample	ULOQ 选择性样本 ULOQ level of selective sample
Ct 值	未检测到 Undetermined	未检测到 Undetermined	未检测到 Undetermined	29. 01	32. 41	26. 97

注: LLOQ: 最低定量限; ULOQ: 最高定量限。
Note. LLOQ. Low limit of quantification. ULOQ. Up limit of quantification.

1.2.2 NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后体内组织分布研究

选取重度免疫缺陷 NOG 小鼠 36 只, 雌雄各半, 单次静脉注射 3.5×10^7 cells/kg HUCMSCs, 分别于 6、12、24、72 h、1 周、2 周各取 6 只小鼠 (雌雄各半) 麻醉, 采集血液 (EDTA 抗凝) 后剖检, 取肺、肾、心脏、肝、大脑、脊髓、胃、小肠、脂肪、皮肤、脾、睾丸 (子宫、卵巢) 等组织后 -80℃ 冻存。提取各组织 DNA, 采用已验证的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法测定各组织中人源 SRY 基因 DNA 的含量, 进一步研究 HUCMSCs 在各组织中的分布情况。

1.2.3 免疫缺陷小鼠静脉注射 HUCMSCs 急性毒性考察及定植分析研究

NOG 小鼠 18 只, 雌雄各半, 分为对照组和干细胞输注组, 其中干细胞输注组 12 只小鼠静脉注射 HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg (浓度 3.5×10^6 cells/mL); 对照组 6 只小鼠静脉注射相同体积的 0.9% 氯化钠注射液, 单次给药, 给药体积均为 10 mL/kg。给药过程中及给药后观察小鼠的反应情况, 连续观察 29 d, 记录所有出现的症状起始时间、严重程度、持续时间及死亡情况; 干细胞输注组于给药后 72 h、2、4 周分别取 4 只动物 (雌雄各半) 进行剖检, 肉眼观察各脏器是否有异常变化, 并采集肺制作石蜡切片, 利用免疫组化法检测人源线粒体蛋白表达, 以此判断 HUCMSCs 在肺组织中的定植情况。

1.3 统计学分析

从 Step One Plus 荧光定时定量 PCR 仪获得分

析物的拷贝数 Ct 值, 用 Excel 软件 (Microsoft Excel 2016) 对实验数据进行录入、计算、汇总整理, 计算平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 对校正样品建立标准曲线, 计算样品和校正标样、质控样品及实际样品的浓度等。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学研究

2.1.1 选择性

稀释液 (TE)、预混液、空白基质或空白基质添加标准品浓度为 1.00×10^2 copies/μL (LLOQ) 和 1.00×10^7 copies/μL (ULOQ) 的样本, 测定结果为稀释液 (TE)、预混液和空白基质的样本 Ct 值均为 Undetermined; LLOQ 和 ULOQ 样本均有 Ct 值。结果显示本方法符合生物样本分析要求。见表 3。

表 3 标准曲线准确度和精密度结果

Table 3 Accuracy and precision of standard curve				
批次 Batch	理论浓度 (μL) Theoretical concentration copies (μL)	平均值 (μL) Average copies (μL)	RSD (%)	回算准确 度 (%) Correction accuracy (%)
SC-1	1.00×10^2	1.05×10^2	20.7	105.0
SC-2	2.00×10^2	1.87×10^2	11.6	93.3
SC-3	2.00×10^3	2.04×10^3	10.3	101.9
SC-4	5.00×10^4	5.18×10^4	9.2	103.6
SC-5	2.00×10^5	2.14×10^5	13.0	106.9
SC-6	1.00×10^6	9.70×10^5	8.1	97.0
SC-7	8.00×10^6	7.97×10^6	12.9	99.6
SC-8	1.00×10^7	9.84×10^6	10.0	98.4

2.1.2 标准曲线和线性范围

最低检测浓度为 1.00×10^2 copies/ μ L,检测范围为 $1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^7$ copies/ μ L,标准品回

算浓度在理论值的 93.3% ~ 106.9%,平均浓度的 RSD(%) 为 8.1% ~ 20.7%。结果符合可接受标准。准确度和精密度均符合可接受标准。见表 4。

表 4 批间和批内准确度和精密度分析

Table 4 Analysis of accuracy and precision between and within batches							
指标 Index		ULOQ (1.00×10^7 copies/ μ L)	HQC (7.50×10^6 copies/ μ L)	MQC (1.00×10^4 copies/ μ L)	LQC (3.00×10^2 copies/ μ L)	LLOQ (1.00×10^1 copies/ μ L)	
批内 Within- batch	批次 1 Batch 1	平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.95×10^6	7.08×10^6	1.18×10^4	3.13×10^2	87.1
		SD	12.1	24.3	4.40×10^2	6.90×10^5	4.20×10^5
		RSD (%)	13.9	7.8	3.7	9.8	4.7
		准确度 (%) Accuracy (%)	87.1	104.4	118.3	94.3	89.5
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	7.91×10^6	5.68×10^6	1.15×10^4	3.33×10^2	1.47×10^2
	批次 2 Batch 2	SD	1.14×10^5	1.15×10^5	1.37×10^3	40.4	16.4
		RSD (%)	1.4	2.0	14.5	12.1	11.1
		准确度 (%) Accuracy (%)	79.1	75.8	114.7	111.1	147.4
		平均值(μ L) Average opies (μ L)	8.98×10^6	6.26×10^6	9.45×10^3	2.66×10^2	1.01×10^2
	批次 3 Batch 3	SD	3.11×10^5	4.20×10^5	2.08×10^2	32.4	16.2
		RSD (%)	3.5	6.7	2.2	12.2	16.1
		准确度 (%) Accuracy (%)	89.8	83.4	94.5	88.6	100.6
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.61×10^6	6.34×10^6	1.09×10^4	3.04×10^2	1.12×10^2
	批间 Between-batch	SD	5.91×10^5	7.31×10^5	1.40×10^3	41.4	30.3
		RSD (%)	6.9	11.5	12.9	13.6	27.2
		准确度 (%) Accuracy (%)	86.1	84.5	109.2	101.4	111.7
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.61×10^6	6.34×10^6	1.09×10^4	3.04×10^2	1.12×10^2

2.1.3 准确度和精密度

对最低定量限(LLOQ)、低质控样品(LQC)、中质控样品(MQC)、高浓度质控样品(HQC)和最高定量限(ULOQ)共 5 个水平的质控样品进行检测,共检测 3 个批次,每个批次不同的浓度有 3 个样本。批内 5 个水平的质控样品回算浓度均值在理论值的 75.8% ~ 147.4%,LQC、MQC、HQC 和 ULOQ 回算浓度的 RSD%为 1.4% ~ 12.2%,LLOQ 回算浓度的 RSD%为 11.1% ~ 16.1%。批间每个水平质控样品回算浓度均值在理论值的 84.5% ~ 111.7%,RSD%为 6.9% ~ 27.2%。结果符合可接受标准。见表 5。

2.1.4 稳定性

提取后 DNA 样品分别在 -80℃ 冻融 3 次、-80℃ 保存 18、41 和 84 d,每个样本浓度与 0 时测定结果偏差为 -4.79% ~ 6.59%,RSD%为 0.60% ~ 8.12%,表明上述保存条件下稳定性良好。细胞、肝

表 5 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSC 后人源 SRY 基因血液分布结果(copies/ μ L)

Table 5 Blood distribution of human SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously (copies/ μ L)							
批次 Batch		6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
雄 Male	NO.1	236	240	174	86	B	B
	NO.2	1707	B	260	110	58	B
	NO.3	147	B	B	B	B	B
	Mean	697	240	217	98	58	/
	SD	876	/	61	17	/	/
	NO.1	0	0	224	B	B	B
雌 Female	NO.2	125	132	178	B	B	B
	NO.3	203	249	B	B	B	B
	Mean	110	127	201	/	/	/
	SD	103	125	32	/	/	/
	NO.1	0	0	224	B	B	B
	NO.2	125	132	178	B	B	B

注:B;低于定量下限;/:无相关数据。(下同)
Note. B. Below the lower limit of quantification. /. No relevant data available. (The same in the following tables)

组织样品分别在-80℃冻融 3 次、-80℃保存 7、15、30 和 68 d 后,LQC 和 HQC 的样品样本浓度均值与标示浓度偏差在-15.6% ~ 18.1%,表明上述保存条件下稳定性良好。

2.2 免疫缺陷小鼠单次静脉注射给予 HUCMSCs 后在体内的分布情况

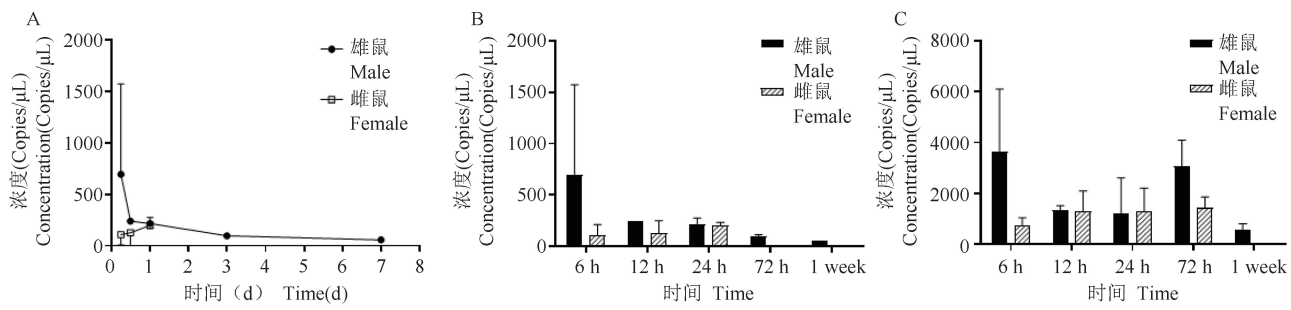
采用已建立的小鼠组织中 HUCMSCs 基因检测方法学,对所有组织分布样品提取 DNA 后进行 RT-qPCR 检测,结果显示:所有 NOG 小鼠的皮肤、睾丸、脾、肾、小肠、脊髓、脑、脂肪、卵巢、子宫、胃、肝、心脏 13 个组织在所有采样点均未测得人源 SRY 基因 DNA,而血液和肺样本中能测到人源 SRY 基因 DNA,提示静脉注射后 HUCMSCs 在 NOG 小鼠血液和肺中有分布。根据组织样品提取 DNA 模板中的浓度、模板体积以及样品质量或体积,可以算得组织样品中人源 SRY 基因 DNA 的浓度(见表 5,表 6)。

结合上述结果,HUCMSCs 在 NOG 小鼠血中的分布规律为:雄性小鼠 HUCMSCs 血中浓度基本呈现静脉注射的药时曲线特征,静脉注射 6 h 均值最高,为 697 copies/μL,然后随时间推移逐渐下降(6 h ~ 1 周有分布),2 周时低于定量下限;雌性小鼠 HUCMSCs 血中浓度均值在 6 ~ 24 h 相对平稳(164

~ 201 copies/μL,浓度缓慢升高),其后均低于定量下限。HUCMSCs 在 NOG 小鼠肺中的分布规律为:雄性小鼠肺组织 HUCMSCs 浓度均值在 6 h 最高(3636 copies/mg),然后随时间推移有所下降,但在 72 h 处有一反跳点(均值 3078 copies/mg),1 周时又有所下降,2 周时低于定量下限;雌性小鼠肺组织 HUCMSCs 浓度均值在 6 ~ 72 h 之内维持相对平稳(757 ~ 1439 copies/mg),其后均低于定量下限(见图 1)。

表 6 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSCs 后人源 SRY 基因肺分布结果(copies/mg)

Table 6 Lung distribution of human SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously (copies/mg)							
批次 Batch		6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
雄 Male	NO.1	4922	1343	499	2084	751	B
	NO.2	788	1199	2820	4105	419	B
	NO.3	5197	1517	345	3043	B	B
	Mean	3636	1353	1221	3078	585	/
	SD	2470	159	1387	1011	235	/
雌 Female	NO.1	1094	445	1273	1259	B	B
	NO.2	564	1995	2224	1134	B	B
	NO.3	614	1482	397	1925	B	B
	Mean	757	1307	1298	1439	/	/
	SD	292	790	913	425	/	/



注:A:药时曲线;B:血液分布变化;C:肺组织分布变化。
图 1 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSCs 后人源 SRY 基因在小鼠血液中的药时曲线、血液分布变化和肺组织分布变化
Note. A. Intravenously. B. Blood distribution. C. Lung tissue distribution.
Figure 1 Drug time curve of SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously, blood distribution and lung tissue distribution of SRY gene in NOG mice

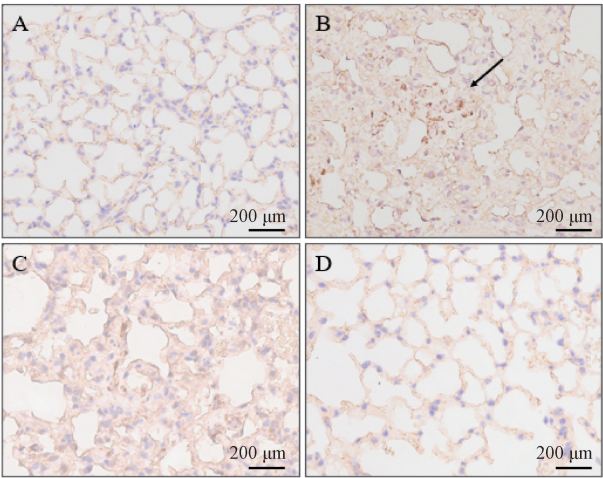
2.3 免疫缺陷小鼠静脉注射 HUCMSCs 急性毒性考察及定植分析

2.3.1 一般反应观察、大体观剖检结果

对照组小鼠整个实验期间均未见明显异常,未引起动物死亡;干细胞组给药后出现短暂可逆的弓背,其余未见明显反应异常,未引起动物死亡;于各检查阶段剖检两组小鼠,各脏器组织外观、色泽、形态和质地等均未发现肉眼可见的大体观异常变化。

2.3.2 定植检测结果

免疫组化结果显示,对照组动物肺组织未见显著棕色点或区域,未检测到 HUCMSCs 定植;干细胞组给药后 72 h,在小鼠肺组织中检测到 HUCMSCs 定植(4/4 只),肺组织可见显著棕色点或区域;而干细胞组给药后 2、4 周时均未检测到 HUCMSCs 定植,肺组织未见显著棕色点或区域。肺组织中定植分析结果与组织分布检测结果基本一致(见图 2)。



注:A:正常对照组动物肺组织中人源线粒体蛋白表达结果;B~D:分别是 HUCMSCs 静脉注射后 72 h、2、4 周小鼠肺组织中人源线粒体蛋白表达结果。

图 2 静脉注射 HUCMSCs 在肺组织的定植情况
Note. A. Expression of human mitochondrial protein in lung tissues of control group. B ~ D. Expression of human mitochondrial protein in lung tissues of NOG mice injected with HUCMSCs intravenously after 72 h, 2 and 4 weeks.
Figure 2 Colonization of stem cells in lung tissue after injected with HUCMSCs intravenously

3 讨论

目前,研究间充质干细胞分布的主要方法有 2 种:(1)细胞示踪技术,比如用胸腺嘧啶核苷类似物 BrdU 标记,绿色荧光蛋白作为报告基因转入细胞后进行检测等。该方法能够观察细胞所处的位置,但只是定性检测,且检测过程中容易出现荧光信号弱、不稳定,不能区分移植细胞死活等各种弊端,导致组织分布结果不准确。(2)RT-qPCR 方法定量检测,比如利用间充质干细胞特征基因设计引物进行检测。本研究建立了 RT-qPCR 检测小鼠组织中人源 SRY 基因的方法(来表征人源干细胞在小鼠体内的分布),最低检测浓度为 1.00×10^2 copies/ μ L,检测范围为 $1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^7$ copies/ μ L,能够在大量鼠组织中检测到微量的间充质干细胞基因并定量。方法学验证结果表明,各项验证指标均符合标准,方法可靠可行,能够为其他干细胞组织分布实验提供参考。

单次静脉注射体内组织分布结果表明,NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后,主要分布于肺和血液中(给药后 1 周内),其他组织未见明显分布。血液、肺组织中 HUCMSCs 浓度分别在 6 ~ 24 h、6 ~

72 h 之内 HUCMSCs 浓度维持相对平稳水平,后随时间推移下降。HUCMSCs 在雌雄小鼠肺部和血液中的分布不一致,表现为雄性小鼠肺部和血液中的分布均高于雌性小鼠,其中雄鼠肺组织中的 HUCMSCs 浓度均值最高(6 h)达到 3636 copies/mg,远大于雌性小鼠。免疫组化法定植验证分析结果显示,干细胞组给药后 72 h 在肺中检测到 HUCMSCs 定植(检出率 100%),而给药后 2、4 周时均未检测到,与组织分布检测结果基本一致,表明 NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后,于 72 h 内定植分布于肺,2 周之后基本代谢出机体。

参考 ICH 发布的 S6(R1)《生物技术药物的临床前安全性评价技术指南》^[16],结合单次给药后急性毒性观察结果:NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后除了出现短暂可逆的弓背,其余未见明显反应异常,不会引起免疫缺陷小鼠死亡,大体观剖检结果显示对小鼠各组织脏器以及毒性靶器官也均未见明显异常,提示单次静脉注射 HUCMSCs 具有较好的安全性。

通过将 HUCMSCs 人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学作为技术支撑,结合实验室已有实验技术基础,后续对 HUCMSCs 开展了一系列全套的安全性研究,包括 NOG 小鼠单次给药毒性研究、重复给药毒性研究(NOg 小鼠、食蟹猴)、局部毒性研究(兔血管刺激、过敏、溶血)、软琼脂克隆形成实验、裸鼠成瘤性实验、NOG 小鼠 26 周体内致瘤实验等研究,在不同物种中进行全方位安全性评价,为后续 HUCMSCs 在临床中静脉注射途径应用提供了安全性资料参考。

参 考 文 献(References)

[1] 闵瑞,刘洁,代喆,等. 新型冠状病毒肺炎发病机制及临床研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(8): 1171-1176.
Min R, Liu J, Dai Z, et al. Advance in clinical study on pathogenesis on COVID-19 [J]. Chin J Nosocomiology, 2020, 30(8): 1171-1176.
[2] Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury [J]. Nat Med, 2005, 11(8): 875-879.
[3] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.
[4] Wang C, Horby PW, Hayden FG, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. Lancet, 2020, 395 (10223): 470-473.
[5] 鞠秀丽. 间充质干细胞治疗新型冠状病毒肺炎的潜在机制和

- 研究进展 [J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58(3): 32-37.
- Ju XL. Potential mechanism and research progress of mesenchymal stem cells in the treatment of 2019 novel coronavirus pneumonia [J]. J Shandong Univ Health Sci, 2020, 58(3): 32-37.
- [6] 何蕊, 陈舒, 江其生. 干细胞治疗前景的展望 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(6): 644-647.
- He R, Chen S, Jiang QS. Prospect of stem cell therapy [J]. J Radioimmunology, 2010, 23(6): 644-647.
- [7] Kim SJ, Choi YS, Ko ES, et al. Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 113(6): 771-777.
- [8] 陈凤, 杨敏, 李彦洁, 等. 人脐带间充质干细胞的分离培养及多向分化潜能研究 [J]. 生物学杂志, 2021, 38(5): 82-85, 90.
- Chen F, Yang M, Li YJ, et al. Research on isolation, culture and multiple differentiation potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. J Biol, 2021, 38(5): 82-85, 90.
- [9] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. Cell Death Differ, 2014, 21(2): 216-225.
- [10] 程洪艳, 昌晓红, 刘彩霞, 等. 干细胞临床研究及管理的现状与未来 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 243-249.
- Cheng HY, Chang XH, Liu CX, et al. Current status and future of stem cell clinical research and management [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(2): 243-249.
- [11] 王晶, 黄云虹, 高晨燕. 我国间充质干细胞产品的注册申请情况及临床审评中的几点考虑 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(15): 1468-1473.
- Wang J, Huang YH, Gao CY. Current application and registration status of mesenchymal stem cell products and considerations on its clinical review [J]. Chin J New Drugs, 2022, 31(15): 1468-1473.
- [12] 毛开云, 范月蕾, 王跃, 等. 间充质干细胞治疗产品开发现状与趋势 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 126-134.
- Mao KY, Fan YL, Wang Y, et al. Development status and trend analysis of mesenchymal stem cells therapeutic products [J]. Chin Biotechnol, 2017, 37(10): 126-134.
- [13] Liang J, Zhang H, Kong W, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 312.
- [14] Alvarez-Nava F, Martínez MC, González S, et al. FISH and PCR analysis of the presence of Y-chromosome sequences in a patient with Xq-isochromosome and testicular tissue [J]. Clin Genet, 1999, 55(5): 356-361.
- [15] 陈勇, 周华蓉, 林晓容. 人类性别决定基因(SRY)的检测及其临床应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(3): 161-164.
- Chen Y, Zhou HR, Lin XR. The detection and clinical application of human sex determination gene on Y chromosome by PCR [J]. J Mol Diagn Ther, 2013, 5(3): 161-164.
- [16] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use(ICH). ICH S6 (R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, 2011 [EB/OL]. <https://www.ich.org/>.

[收稿日期] 2023-04-14