

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.004

人脐带间充质干细胞重复静脉注射动物毒性试验*

刘智彬^{1,3} 洪冠豪^{1,3} 周玉兰² 李鹏¹ 高翔¹ 魏波³ 王家丰^{1Δ}

(广东医科大学附属第一医院 1 干细胞研发与转化中心; 2 生殖医学中心; 3 骨科中心 广东湛江 524001)

摘要 目的:评价多次尾静脉注射脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对小鼠的体内毒性作用。**方法:**48只健康ICR小鼠,按性别和体重随机分为4组(即对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组)。小鼠通过微静脉注射不同剂量hUC-MSCs悬浮液,间隔3天给药1次,共给药4次。记录小鼠摄食量、体重、体温,给药结束后恢复两周后牺牲动物作大体解剖,检查各个器官器质性病变;利用流式细胞仪分别检测CD3、CD4、CD8阳性细胞亚群数量;ELISA试剂盒检测血清IgM、IgG、C3、C4指标;对肺脏、脾脏、肾脏行组织病理学检查。**结果:**实验组与对照组相比较,注射不同剂量干细胞后一般观察、体重、体温、摄食量、IgM以及C3在给药期和恢复期均未发生显著变化。在恢复期,注射中、高剂量hUC-MSCs组血清IgG和C4水平略有降低,但未达到显著水平 $P<0.05$;CD4阳性T细胞集群数量以及CD4/CD8系数在hUC-MSCs中、高剂量组显著上升($P<0.05$)。大体剖检,除脾脏相比溶媒对照组略显增大外其它各器官均未发现肉眼可见明显异常;称重后发现hUC-MSCs高剂量组脾重量与溶媒对照组相比显著升高($P<0.05$)。脾脏、肺脏、肾脏病理学检测未见明显异常。**结论:**健康ICR小鼠尾静脉注射临床剂量hUC-MSCs(1×10^6 cells/kg)可能调动动物免疫反应,此外,未观察到hUC-MSCs对小鼠有明显毒副作用。

关键词:人脐带间充质干细胞;静脉注射;小鼠;毒性

中图分类号:R-33;R331.2;R392 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-216-09

Toxicity Test of Repeated Intravenous Injection of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice*

LIU Zhi-bin^{1,3}, HONG Guan-hao^{1,3}, ZHOU Yu-lan², LI Peng¹, GAO Xiang¹, WEI Bo³, WANG Jia-feng^{1Δ}

(1 Stem Cell Research and Clinical Translation Center; 2 Reproductive Medicine Centre;

3 Orthopaedic center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong, 524001, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the in vivo toxicity of multiple tail vein injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in mice. **Methods:** 48 healthy ICR mice were randomly divided into 4 groups (control, low dose, medium dose and high dose) according to gender and body weight. Mice were injected with different doses of hUC-MSCs suspension through micro vein, once every 3 days, for a total of 4 times. The food intake, body weight and body temperature of mice were recorded. The mice were sacrificed after 2 weeks of recovery after administration, the animals were dissected and the organic lesions of various organs were examined; The number of CD3, CD4 and CD8 positive cell subsets was detected by flow cytometry; Serum IgM, IgG, C3 and C4 were detected by ELISA kit; The lung, spleen and kidney were examined by histopathology. **Results:** Compared with that in the control group, there were no significant changes in general observation, body weight, body temperature, food intake, IgM and C3 during administration and recovery after injection of different doses of stem cells. In the recovery period, the levels of serum IgG and C4 in the middle and high-dose hUC-MSCs groups decreased slightly, but they did not reach a significant level ($P<0.05$); The number of CD4 positive T cell clusters and CD4 / CD8 coefficient increased significantly in hUC-MSCs medium and high dose groups ($P<0.05$). No obvious abnormality was found in other organs except that the spleen was slightly larger than that in the control group; The spleen weight of hUC-MSCs high-dose group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). No obvious abnormality was found in the pathological examination of spleen, lung and kidney. **Conclusion:** Healthy ICR mice injected with clinical dose HUC MSCs (1×10^6 cells / kg) may mobilize animal immune response. However, no obvious toxic and side effects of hUC-MSCs on mice were observed.

Key words: Human umbilical cord mesenchymal stem cells; Intravenous injection; Mice; Toxicity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R392 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-216-09

* 基金项目:广东省科技专项基金项目(2021A05249);广东省医学科学研究基金项目(A2020376);

湛江市科技计划项目(2019A01011;2019A01032)

作者简介:刘智彬(1998-),男,硕士研究生,主要研究方向:干细胞与成骨分化,E-mail: 741435904@qq.com

Δ 通讯作者:王家丰(1983-),男,硕士生导师,副研究员,主要研究方向:干细胞与再生医学,

E-mail: wangjiafeng@gdmc.edu.cn,电话:0759-2386010

(收稿日期:2022-04-18 接受日期:2022-05-13)

前言

干细胞是一类具有原始分化能力的特殊细胞,近年来研究发现,干细胞通过细胞分化或者外泌细胞因子等方式能够改变有机体微环境,在治疗多种难治性疾病应用中具有极大的潜力,越来越多的基础研究揭示了干细胞在多种病变模型中显著改善疾病指标^[1-3]。近年来,干细胞研究在全世界蓬勃发展,美国《科学》杂志曾将干细胞研究评为世界十大科学成就之首。最近,在全球抗击新冠肺炎的临床探索中,干细胞取得了良好的疗效^[6-8],也助推干细胞行业的快速发展。

目前国内外对于 hUC-MSCs 体内毒性的研究并不多,且多为单一疾病模型针对性的探索^[9-11]。虽然多个研究表明体内注射 hUC-MSCs 无明显不良反应^[12,13],但不同干细胞制剂差异以及针对不同疾病(疾病模型)的使用方法与治疗部位的不同,导致不同研究报道的干细胞制剂体内的安全剂量范围以及可能的毒性反应对其它研究的参考意义不大。而严格按照根据体表面积和体重折算人体使用干细胞剂量,并考察其在健康动物体内的毒性反应,可为干细胞临床研究提供有效的基础毒性安全指导。

与一般的药物不同,干细胞是具有生物活性的一种类型的完整活细胞的统称,不同来源的干细胞通过不同方式进入体内后,其代谢情况可能不尽相同,干细胞制剂在机体内是否存活、分化及其生物安全性很难评价^[4]。因此,《干细胞临床研究管理办法(试行)》规定,所有拟开展的干细胞临床研究必须在动物体内评估干细胞制剂在体内环境的驻留、代谢与分化等情况。本研究拟评估通过静脉多次注射人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对健康小鼠的机体各个器官的影响,分析不同剂量多次注射脐带间充质干细胞在机体内的毒性数据,为干细胞临床研究的细胞使用剂量确定与安全性评估提供可靠的依据,具有普遍的指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

实验使用健康 6 周龄 ICR 小鼠作为实验动物,实验动物分为实验组和对照组;实验组有 3 个不同的干细胞剂量组。动物实验经过广东医科大学实验动物中心伦理许可。

实验用人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)来源于广东医科大学附属医院干细胞研发与临床转化中心。hUC-MSCs 培养使用 a-MEM 培养基添加 10% 血清替代物(UltraGORTM),每隔 3 天完全换液,细胞密度大于 90%后,胰酶替代物(TrypLE(TM)Express)消化、传代;使用 P5 代 hUC-MSCs 制备干细胞制剂。

1.2 细胞剂量设计依据

临床拟用剂量:受试细胞临床拟用剂量为 1×10^6 cells/kg,根据体表面积和体重折算为小鼠等效剂量为 11.2×10^6 cells/kg(采用通用公式 " $\log S = 0.8762 + 0.698 \log W$ " 计算,人与小鼠的折算系数为 11.2)。hUC-MSCs 临床一般采用静脉输注或局部注射方式给药,本试验旨在评价通过小鼠尾静脉注射 hUC-MSCs 在体内的毒性作用。溶媒对照组和受试物组分别采用 1 mL 无菌注射器经尾静脉多次输注同等容量的复方电解质(含 5% 人血清白蛋白)和不同剂量的脐带间充质干细胞,给药体积为 20 mL/kg,输注细胞速度为 60-90 S/只。动物经过 2 周适应期后开始给药;间隔 3 天给药一次,共给药 4 次;给药结束后恢复两周。

预试验结果:分别采用三个剂量(高剂量 2.2×10^8 cells/kg [20 倍临床等效剂量]、中剂量 1.1×10^8 cells/kg [10 倍临床等效剂量]、低剂量 3.3×10^7 cells/kg [3 倍临床等效剂量])。经尾静脉注射脐带间充质干细胞给予小鼠,给药后高剂量组 6 只动物中有 1 只出现精神不佳,呼吸急促,10 分钟后恢复。分析原因可能注射速度过快所致,此外未观察到动物其它异常与死亡;中、低剂量组动物未观察到呼吸频率、体温改变等异常反应。

1.3 试验剂量设计及分组

根据以上资料,按照随机分组方法,选择体重居中的 48 只小鼠,按性别和体重随机分为 4 组(即对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组),每组 12 小鼠,雌雄各 6 只(表 1)。

表 1 试验分组和剂量设置
Table 1 Test grouping and dose setting

Groups	Test substance	Dose (cells/kg)	Clinical equivalent dose multiples	Injection volume (mL/kg)	Animan number	
					♀	♂
Menstruum	Compound electrolyte (add 5% human serum albumin)	0	-	20 mL/kg	6	6
Low dose group	hUC-MSCs suspension	3.3×10^7	3	20 mL/kg	6	6
Middle dose group	hUC-MSCs suspension	1.1×10^8	10	20 mL/kg	6	6
High dose group	hUC-MSCs suspension	2.2×10^8	20	20 mL/kg	6	6

1.4 一般观察

注射前对动物进行一般临床症状观察,观察内容包括动物外观、行为活动、精神状态、粪便性状等。输注后笼旁观察,1 h 内每 15 min 观察记录 1 次,2~3 h 每 1 h 观察 1 次。输注后次日开始,每天观察 1 次,连续观察 14 天。记录所有动物的死亡情况、中毒症状、严重程度、持续时间、是否可逆等。

1.5 体重与体温监测

给药开始后每次给药前测定 1 次,恢复期每周测 1 次,试验过程中对死亡动物称重,解剖前对动物称重。

1.6 摄食量

每周每笼按需添加饲料两次,保证饲料充足,动物可自由取食;每周测量动物体重时同时测量饲料消耗量。

1.7 血液 T 淋巴细胞分群检测

动物禁食不禁水过夜,异氟烷麻醉后眼眶取血。血液采集到 EDTA 抗凝管,采集后立即上下颠倒混匀,6 h 内送检,外周血添加不同标记的抗体孵育后裂解红细胞,离心后用流式细胞仪分别检测 CD3、CD4、CD8 阳性细胞亚群数量。

1.8 血清学检测

血液采集到 1.5 mL EP 管,室温放置 30 min~50 min 后,3000 r/min 离心 15 min,取血清。ELISA 试剂盒检测血清 IgM、IgG、C3、C4 指标。

1.9 大体解剖检查及组织病理学检查

试验过程中因濒死而安乐死的动物、死亡动物应及时进行大体解剖,其他动物在观察期结束后安乐死并进行大体解剖。肉眼观察注射部位、皮肤、乳腺、肝脏、胰腺、脾脏、肾脏、肾上腺、胃、肠道、肠系膜淋巴结、膀胱、睾丸、附睾、精囊、前列腺、子宫、卵巢、输卵管、阴道、唾液腺、颈部淋巴结、气管、食管、甲状腺、甲状旁腺、胸腺、主动脉、心脏、肺脏、大脑、小脑、脑干、垂体、脊髓、眼球、视神经、骨骼肌等各器官和组织的变化,并做好记录。进行病理解剖学检查,测定脏器(脑、心脏、肝脏、肺脏、肾

脏、脾脏)重量。对以往干细胞主要影响的组织脏器(包括肺脏、脾脏、肾脏)进行固定,并进行病理检查。

1.10 安乐死

所有动物使用 CO₂ 安乐死,试验结束后存活动物采用异氟烷麻醉采血后执行安乐死。

1.11 数据统计处理方法

使用 SPSS 统计软件 25.0,对试验数据进行统计描述和分析。对于体重、血液学、血液生化学、脏器重量等数据,行 One-Way ANOVA 方差分析;如方差分析检验结果显著($P < 0.05$),则进一步用 Dunnett 参数检验法将各剂量组与溶媒对照组进行两两比较检验,如方差分析检验结果不显著($P > 0.05$),则计算结束。

2 结果

2.1 动物体重、体温变化

与溶媒对照组相比,受试各组动物体重及体重增长、体温变化在给药期与恢复期均无显著性差异(图 1、2)。

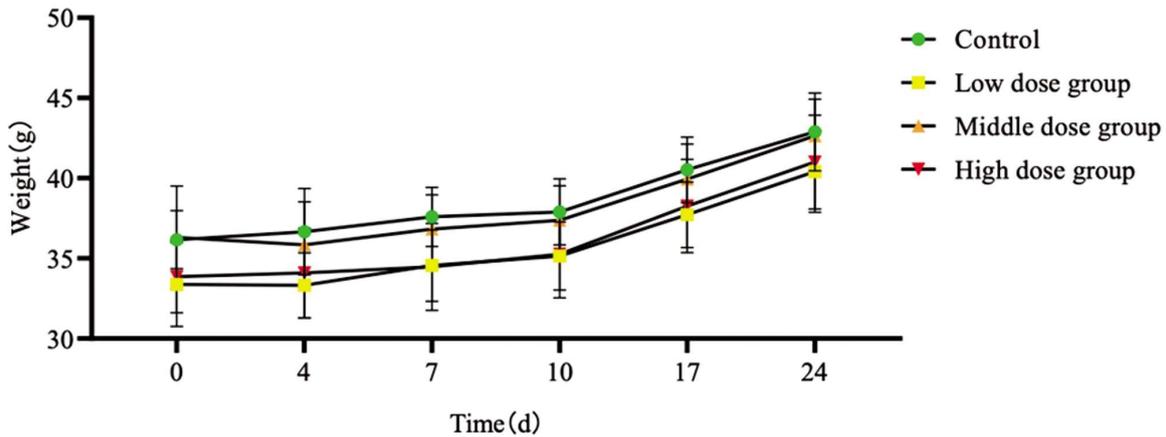


图 1 试验期间体重变化情况

Fig. 1 Body weight changes during the test

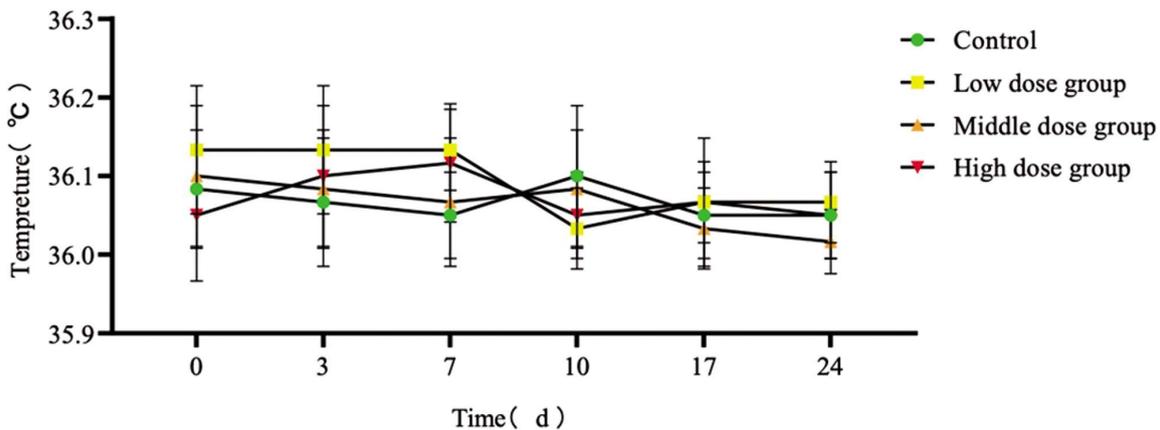


图 2 试验期间体温变化情况

Fig. 2 Body temperature changes during the test

2.2 摄食量变化

与溶媒对照组相比,受试物各剂量组动物的摄食量在整个实验期均无明显差异(图 3)。

2.3 血清生化检测

在给药期与恢复期对照组与 hUC-MSCs 各剂量组之间血清 IgM、IgG、C4、C3 水平未发现显著性差异 $P > 0.05$ (图 4)。

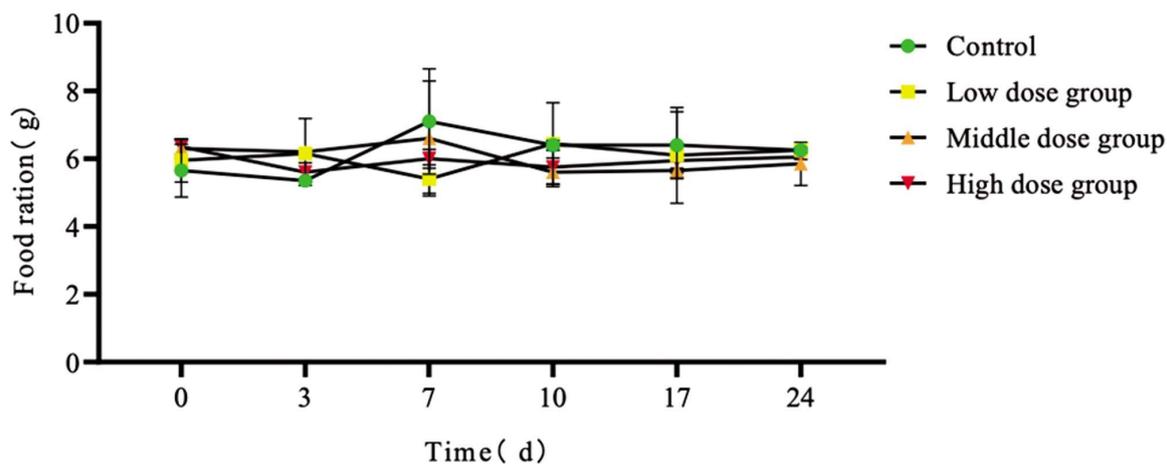


图3 试验期间摄食量变化情况
Fig. 3 Food intake changes during the experiment

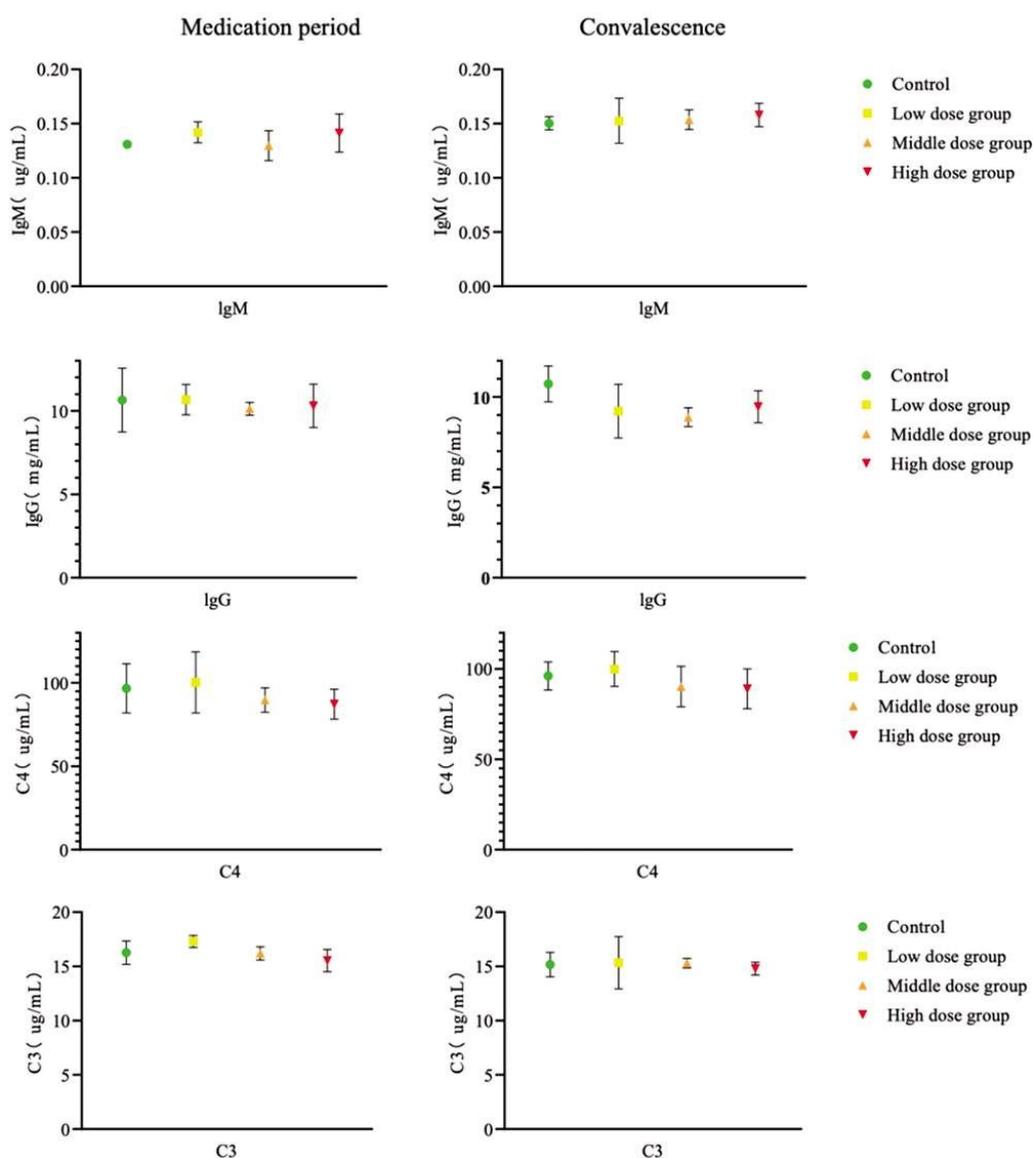


图4 血清免疫学指标变化情况
Fig. 4 Serum immunological changes

2.4 血液 T 细胞亚群检测

流式细胞仪检测血液不同表面抗原 T 细胞集群情况:

给药期:hUC-MSCs 低、中剂量组跟溶媒对照组 CD3 阳性

T 细胞无显著变化,hUC-MSCs 高剂量组与溶媒对照组相比,显著升高($P<0.05$)(图 5)。hUC-MSCs 低、中剂量组跟溶媒对照组 CD4 阳性 T 细胞无显著变化,hUC-MSCs 高剂量组与溶媒

对照组相比,显著升高($P<0.05$)(图5)。CD4/CD8 系数与溶媒对照组相比较无显著性差异($P>0.05$)(图5)。

恢复期:CD3 阳性 T 细胞数量与溶媒对照组比较,无显著

性差异(图5)。CD4 阳性 T 细胞集群数量在 hUC-MSCs 中、高剂量组显著上升 ($P<0.05$)(图5)。CD4/CD8 系数 hUC-MSCs 中、高剂量组与溶媒对照组相比显著性上升($P<0.05$)(图5)。

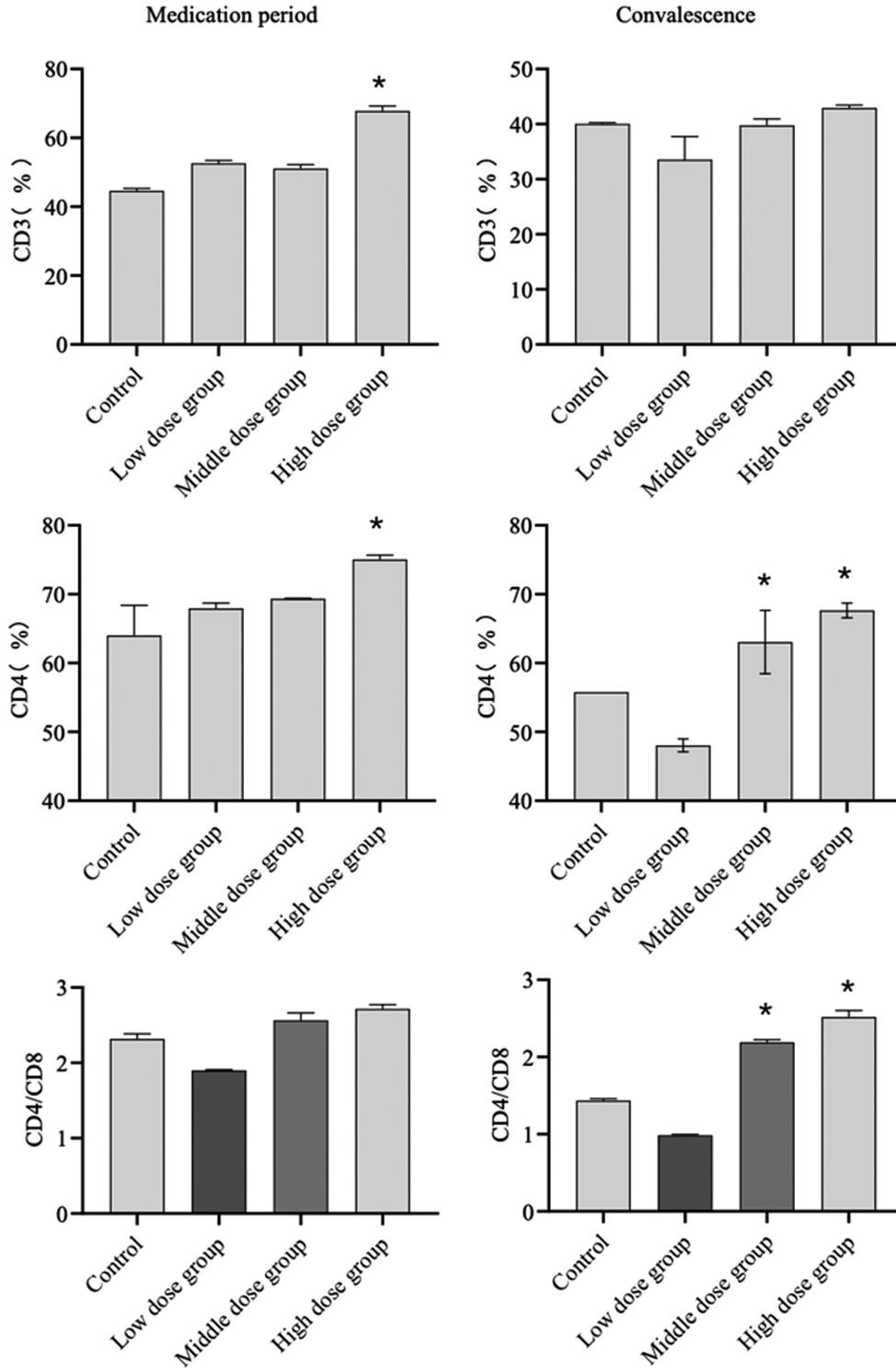


图5 血液 T 细胞亚群流式细胞仪检测

Fig. 5 Detection of blood T cell subsets by flow cytometry

2.5 脏器重量变化

给药期:与溶媒对照组相比,hUC-MSCs 各剂量组动物的各脏器重量均未见统计学意义上的显著性差异($P>0.05$)(图6)。

恢复期:与溶媒对照组相比,hUC-MSCs 各剂量组动物的

心、肝、肺、肾、脑重量均未见统计学意义上的显著性差异;脾脏重量 hUC-MSCs 剂量组从低到高依次递增趋势,hUC-MSCs 高剂量组脾重量与溶媒对照组相比显著升高($P<0.05$)(图7)。

2.6 大体解剖观察与病理检查

溶媒对照组以及低、中、高 hUC-MSCs 剂量组,大体剖检,

除脾脏相比溶媒对照组略显增大外其它各器官未发现肉眼可见明显异常(图 8)。我们选择肺,肾以及脾脏进行固定后切片

HE 染色,光学显微镜进行组织病理学检查。

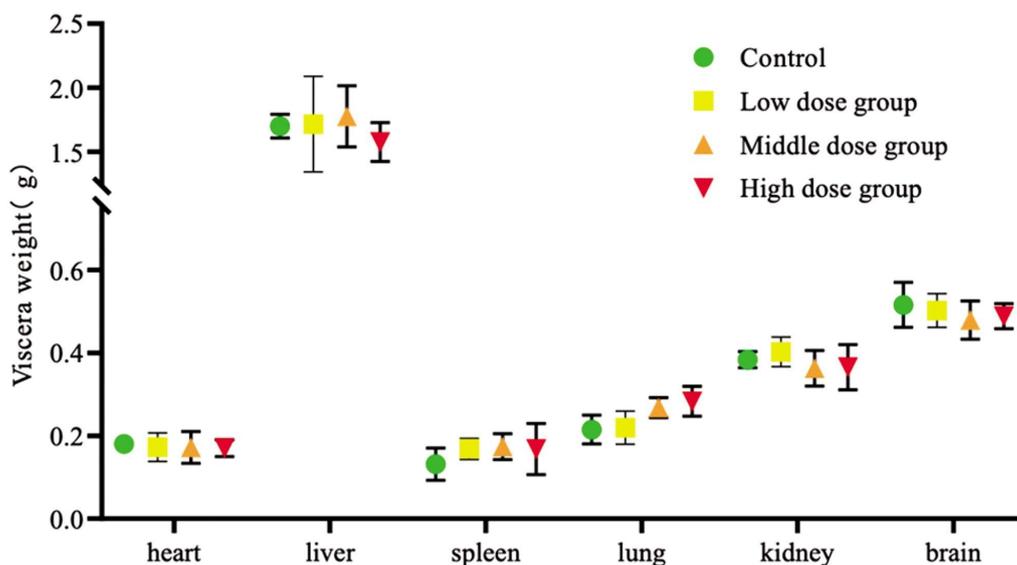


图 6 给药期不同分组动物主要脏器重量情况

Fig. 6 Main organs weights of different groups during medication period

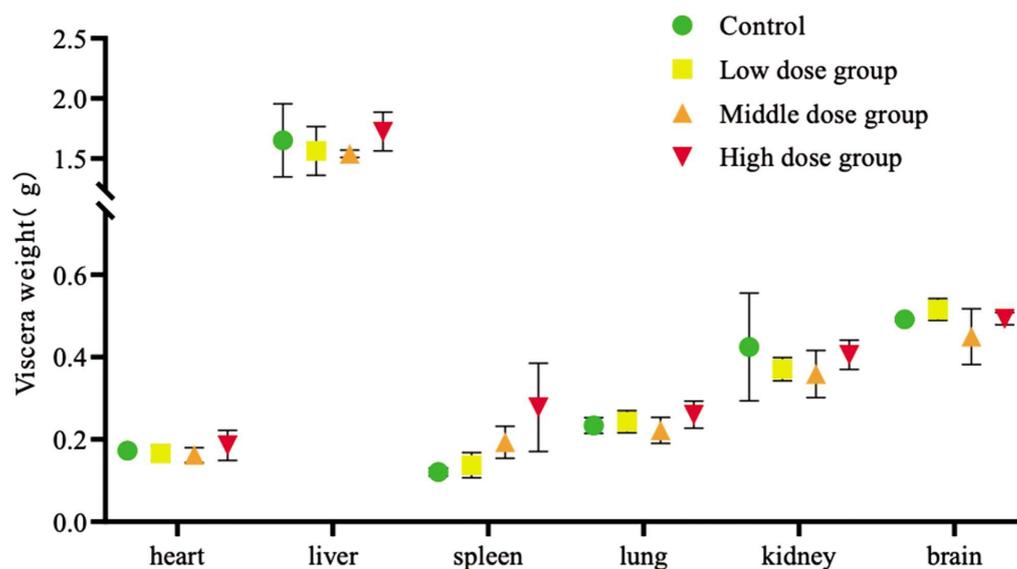


图 7 恢复期不同分组动物主要脏器重量情况

Fig. 7 Main organs weights of different groups during convalescence

光学显微镜下观察肺脏组织切片,10× 镜下可见肺组织终末细支气管,肺泡管,肺泡囊,肺泡隔都存在,部分可见血管伴行;20× 镜下可见部分细支气管以及肺泡开口,上皮单层柱状,肺泡腔可见两种上皮,一种立方,一种仅能依据其面向肺泡腔的扁平的核区分布(图 9),均未见明显异常。

光学显微镜下观察脾脏组织切片,10× 镜下可见红髓及白髓,可见被膜表面被覆单层扁平上皮,被膜内的纤维结缔组织伸入实质形成小梁,白髓呈蓝色,沿中央动脉分布,红髓位于白髓之间及白髓与小梁之间,内含大量红细胞,因此大体上观察呈红色。20× 镜下可见白髓由动脉周围淋巴鞘、淋巴小结和边缘区构成,红髓分布于被膜下,由脾索和脾血窦组成,脾索含较多的淋巴细胞及浆细胞,巨噬细胞、树突状细胞(图 10)。均未见明显异常。

显微镜下观察肾脏组织切片,10× 镜下隐约可见肾表面有薄层纤维结缔组织在薄膜,以弓形血管为界分为皮质及髓质,髓质可见大量平行排列的小管。20× 镜下可见肾小囊及血管球组成的肾小球结构,肾小囊壁层为单层扁平上皮,包绕在血管球外,可见深红色的近曲小管及浅红色的远曲小管(图 11)。均未见明显异常。

3 讨论

虽然很多研究证实脐带来源的间充质干细胞免疫原性比较低,在移植过程的排斥作用不明显^[15,16]。但是体外培养细胞,尤其是异体来源的间充质干细胞对于被移植体来说仍然具有异质性,并且不同体外培养条件也可能影响干细胞移植体内后对机体的毒性作用。尤其是临床研究中需要多次移植间充质

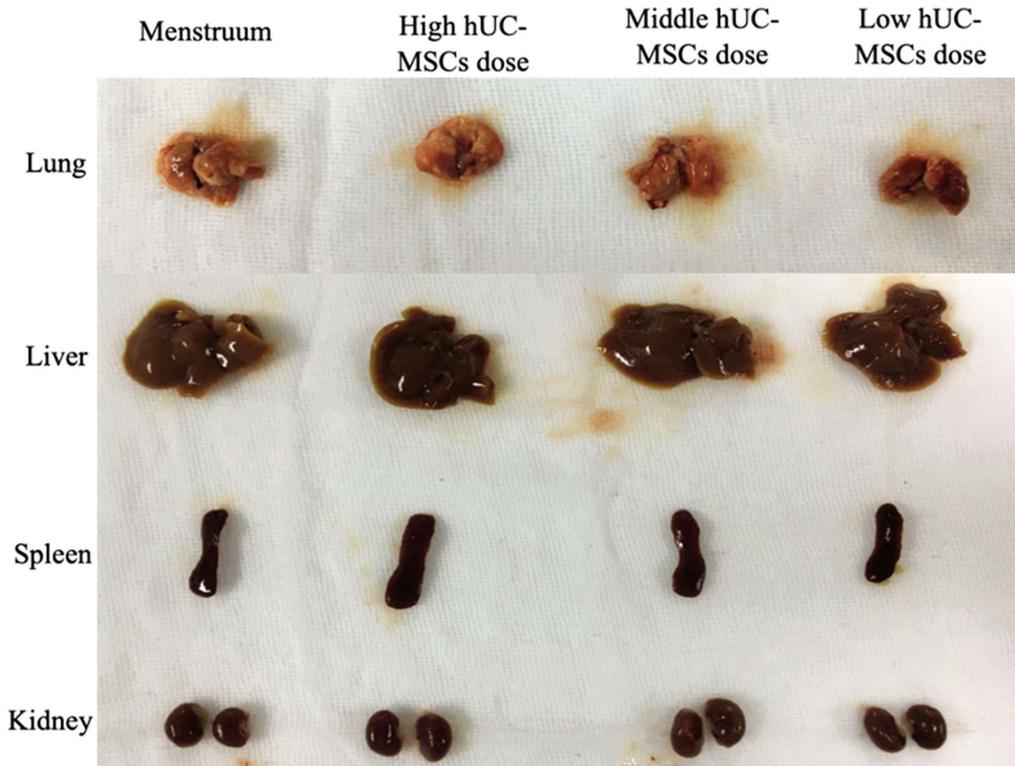


图 8 大体解剖后肺、肝、脾、肾脏比较

Fig. 8 Comparison of lung, liver, spleen and kidney after gross anatomy

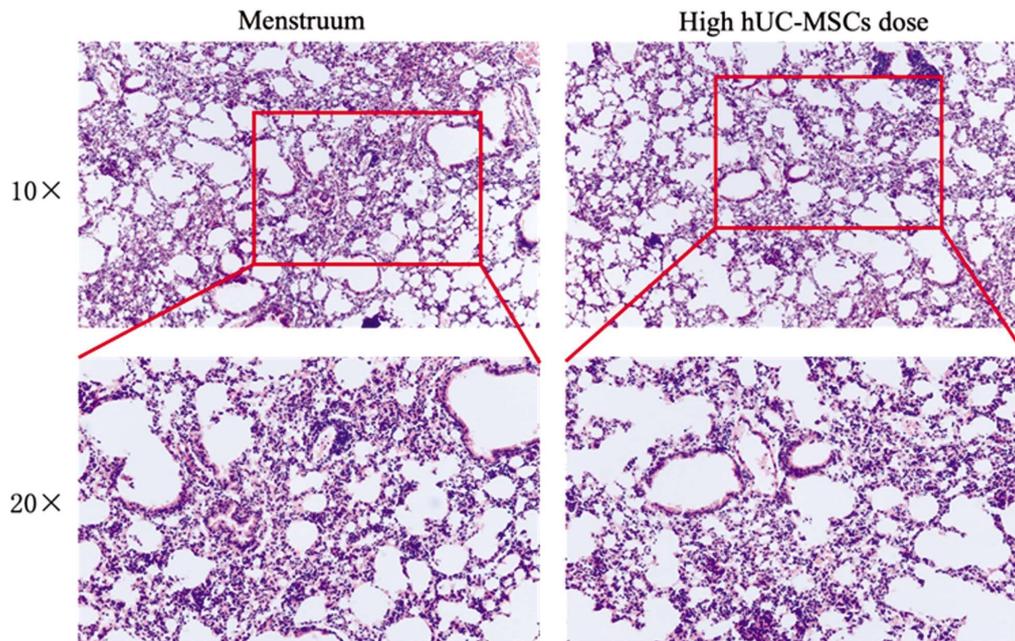


图 9 肺脏 HE 染色病理检查

Fig. 9 Pathological examination of lung HE staining

干细胞,其移植剂量及其移植次数对机体的毒性作用是干细胞临床研究的重要安全性评估必不可少的内容^[4]。

针对不同病变,干细胞在临床研究中的使用剂量可能存在较大差异,本研究参考目前主流的干细胞临床研究方案的推荐剂量(1×10^6 cells/kg)^[17,18]。然而,可能针对不同的适应症以及不同类型的干细胞,干细胞使用剂量也有较大的变化^[19,20];我们设计了推荐剂量的3、10、20倍剂量组,以充分评估过高剂量在体内毒性作用,为临床研究提供更为宽泛的安全剂量范围。

通过连续4次经尾静脉注射,溶媒对照组及hUC-MSCs各组动物临床观察在给药器与恢复期均未见异常,各组动物给药前后眼科检查均未见异常。血液T淋巴细胞在高剂量hUC-MSCs组给药期间有显著上升,表明hUC-MSCs可能参与免疫调节反应,能够调动免疫细胞,激活免疫反应;这跟一些已有的临床研究中观察到的现象类似^[21-23]。CD4/CD8比例在恢复期依然高于对照组,表明给药结束后,hUC-MSCs引起的免疫调节反应可能依然存在。所测血液其他免疫学指标未观察到显

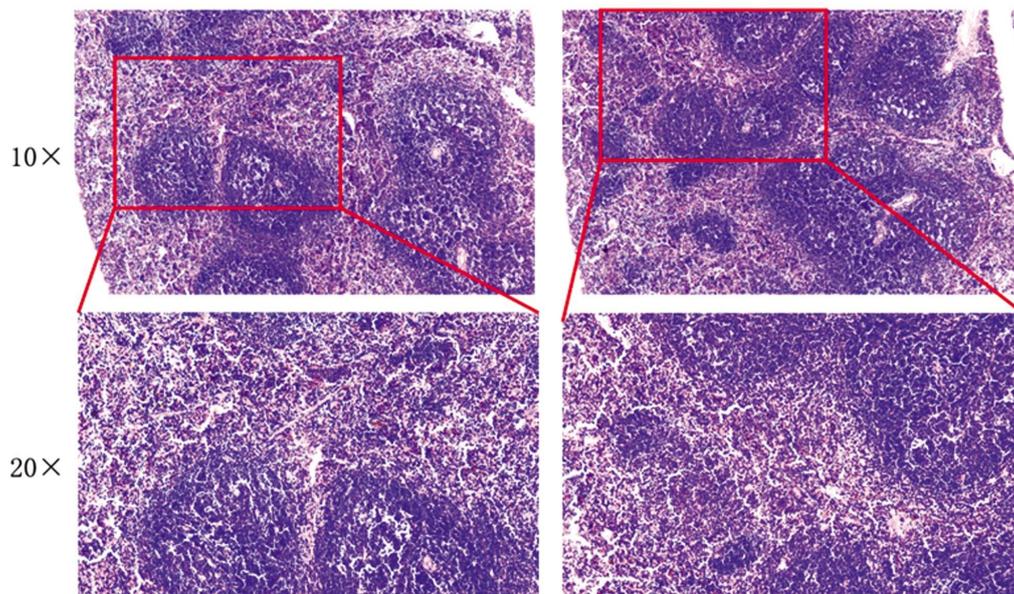


图 10 脾脏 HE 染色病理检查

Fig. 10 Pathological examination of spleen by HE staining

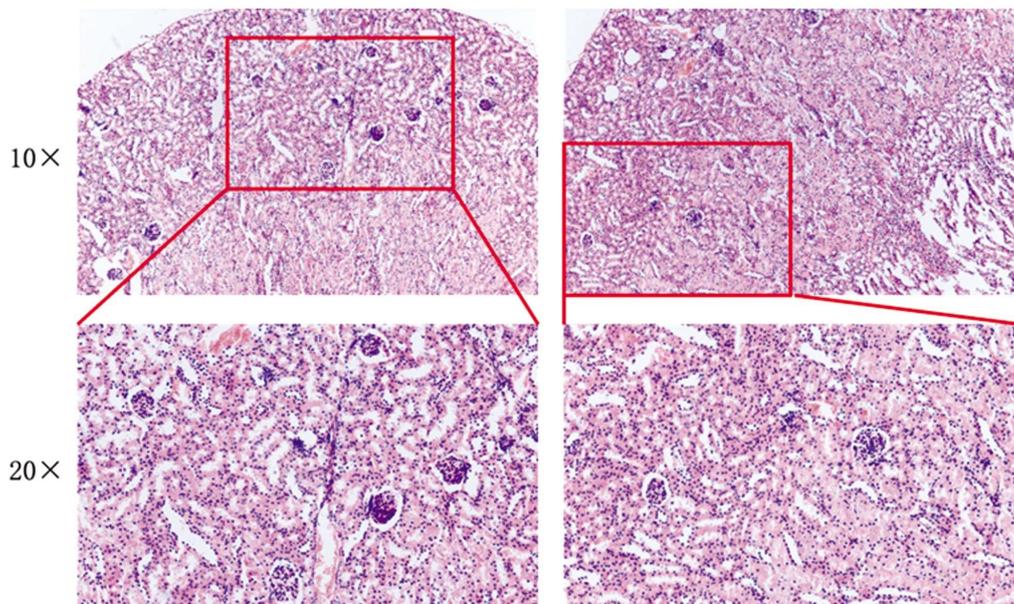


图 11 肾脏 HE 染色病理检查

Fig. 11 Pathological examination of renal HE staining

著改变,未发现异常免疫反应。实验动物在给药期及恢复期均未观察到实质性动物行为改变,无动物死亡案例,大体解剖发现 hUC-MSCs 处理组脾脏略有增大,病理检查未发现明显病理改变。鉴于体外培养的 hUC-MSCs 可能细胞个体略大,在静脉输注方式使用体外培养的 hUC-MSCs 可能给肺脏的毛细血管造成比较严重的栓塞风险,这也是在干细胞临床研究中重点规避的问题,甚至采用局部移植干细胞来代替静脉输注干细胞方案^[24]。我们特地检查受试动物的肺脏病理,并发现本研究所有剂量分组的肺脏组织并没有明显病理变化。以上各项结果表明健康 ICR 小鼠尾静脉注射临床剂量 hUC-MSCs (1×10^6 cells/kg)是安全可行的,高剂量(30 倍临床剂量)可能调动动物免疫反应,但未观察到明显毒副作用。

不同病变状态下,干细胞移植引起的体内毒性作用可能不同,因此在不同病理模型中评估细胞毒性是必要的。然而,评估干细胞移植到健康动物体内的毒性作用,对于评估是否因为病变原因引起相关毒性作用具有基础指导意义;也是干细胞临床研究安全性评价的重要参考。在干细胞临床研究中,不同的干细胞移植方式在体内的毒性作用同样可能存在差异;静脉输注作为最普遍也是最主要的干细胞移植方式。本研究在健康动物中评估静脉输注不同剂量 hUC-MSCs 的体内毒性作用是干细胞临床前的重要安全性评估,将成为干细胞临床研究实验方案设计的重要依据。

参考文献(References)

- [1] Kim Baumann. Stem cells: Regenerating the skin of a young patient [J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(1): 4-5

- [2] Khadijeh Bahrehbar, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi, Fereshteh Esfandiari, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells improved premature ovarian failure[J]. *World J Stem Cells*, 2020, 12(8): 857-878
- [3] Farzaneh M, Anbiyaiee A, Khoshnam SE. Khoshnam. Human Pluripotent Stem Cells for Spinal Cord Injury [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2020, 15(2): 135-143
- [4] Garitaonandia I, Gonzalez R, Sherman G, et al. Novel Approach to Stem Cell Therapy in Parkinson's Disease [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(14): 951-957
- [5] Ogay V, Sekenova A, Li Y, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Atherosclerosis[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2021, 16(7): 897-913
- [6] Du J, Li H, Lian J, et al. Stem cell therapy: a potential approach for treatment of influenza virus and coronavirus-induced acute lung injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 192
- [7] Lanzoni G, Linetsky E, Correa D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(5): 660-673
- [8] Saleh M, Vaezi AA, Aliannejad R, et al. Cell therapy in patients with COVID-19 using Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a phase I clinical trial[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 410
- [9] Yang Y, Cao TT, Tian ZM, et al. Subarachnoid transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cell in rodent model with subacute incomplete spinal cord injury: Preclinical safety and efficacy study[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(2): 112184
- [10] Yun JW, Ahn JH, Kwon E, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute liver injury: Hepatoprotective efficacy, subchronic toxicity, tumorigenicity, and biodistribution[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 81: 437-447
- [11] Kim HJ, Cho KR, Jang H, et al. Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase I clinical trial [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2021, 13(1): 154
- [12] Wang Y, Han ZB, Ma J, et al. A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(9): 1401-1408
- [13] 胡泽斌, 王立生, 崔春萍, 等. 干细胞临床应用安全性评估报告[J]. *中国医药生物技术杂志*, 2013, 8(5): 349-361
- [14] Hao J, Ma A, Wang L, et al. General requirements for stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(12): 12926
- [15] Riordan NH, Hincapié ML, Morales I, et al. Allogeneic Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Autism Spectrum Disorder in Children: Safety Profile and Effect on Cytokine Levels[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(10): 1008-1016
- [16] Kim HS, Lee JH, Roh KH, et al. Clinical Trial of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells for the Treatment of Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: Phase I/IIa Studies [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 248-255
- [17] Levy ML, Crawford JR, Dib N, et al. Phase I/II Study of Safety and Preliminary Efficacy of Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Chronic Stroke[J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2835-2841
- [18] 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
- [19] Ra JC, Shin IS, Kim SH, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1297-308
- [20] Ahn SY, Chang YS, Sung SI, et al. Mesenchymal Stem Cells for Severe Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants: Phase I Dose-Escalation Clinical Trial [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(12): 847-856
- [21] Boberg E, von Bahr L, Afram G, et al. Treatment of chronic GvHD with mesenchymal stromal cells induces durable responses: A phase II study[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(10): 1190-1202
- [22] Fukumitsu M, Suzuki K. Mesenchymal stem/stromal cell therapy for pulmonary arterial hypertension: Comprehensive review of preclinical studies[J]. *J Cardiol*, 2019, 74(4): 304-312
- [23] Payares-Herrera C, Martínez-Muñoz ME, Vallhonrat IL, et al. Double-blind, randomized, controlled, trial to assess the efficacy of allogeneic mesenchymal stromal cells in patients with acute respiratory distress syndrome due to COVID-19 (COVID-AT): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial [J]. *Trials*, 2021, 22(1): 9
- [24] Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, et al. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 10889-10897