

人牙髓间充质干细胞致瘤性试验

荆宝琴¹, 段蕊¹, 王磊¹, 裴天仙¹, 孙程颖¹, 苏敏², 张金晓^{1*}, 杨月峰^{2*}

1. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300301

2. 北京三有利和泽生物科技有限公司, 北京 100070

摘要: 目的 观察人牙髓间充质干细胞(HDP-MSCs)对免疫缺陷小鼠的致瘤性作用。方法 雌性NOG小鼠随机分为4组: 对照组和HDP-MSCs低、中、高剂量(2×10^6 、 5×10^6 和 2×10^7 cells/kg)组, 每组20只; 双后肢交替im给药, 每周给药1次, 共给药6个月(27次); 试验期间进行大体观察、体质量检查和肿瘤触诊, 给药结束进行解剖检查、脏器检查和组织病理学检查。结果 对照组死亡2只动物, 其中1只动物颈部出现肿块; HDP-MSCs低剂量死亡1只动物, 另有1只动物出现弓背; 中剂量组1只动物濒死; 高剂量动物未见明显异常; 低、中、高剂量组触诊未发现肿瘤。小鼠体质量无异常。解剖后对照组和HDP-MSCs低、中剂量个别动物发现有肿块。各剂量组脏器质量及系数无异常、组织病理学检查无药物相关性病变。结论 HDP-MSCs在本试验剂量下连续im给药6个月, 致瘤试验结果为阴性。

关键词: 人牙髓间充质干细胞; 致瘤性; NOG小鼠; im给药

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2390-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.006

Tumorigenicity test of human dental pulp mesenchymal stem cells

JING Baoqin¹, DUAN Rui¹, WANG Lei¹, PEI Tianxian¹, SUN Chengying¹, SU Min², ZHANG Jinxiao¹, YANG Yuefeng²

1. Tianjin Tiancheng Drug Assessment Research Co., Ltd. Tianjin 300301, China

2. Beijing SH Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100070, China

Abstract: Objective To evaluate tumorigenicity of human dental pulp mesenchymal stem cells (HDP-MSCs) on NOG mice. **Methods** NOG mice were divided into four groups (20 mice each group), which included low, medium, high dose (2×10^6 、 5×10^6 and 2×10^7 cells/kg) groups and one blank control group. The mice were given HDP-MSCs by alternate intramuscular injection in both hind limbs once a week and this operation last for 6 months (27 times in total). Clinical observation, weight examination and tumor palpation on NOG mice were conducted in experimental observation period. Gross anatomy, organs and histopathology on NOG mice were examined at the end of the experiment. **Result** Two animals of the blank control group died, one of which had a neck mass. One animal died in the low dose group, and another animal observed one symptoms of arched back. One animal in the middle dose group was in a state of near death. The animals in the high dose group were no obvious abnormality. There was no tumor found on tumor palpation in the low, medium and high dose groups. The mice weight was normal. Tumor was found on autopsy in blank control group, low and medium dose group. Viscera weight and coefficient was no abnormality. No drug-related lesion was found in histopathology. **Conclusion** The result of tumorigenicity test of HDP-MSCs on NOG mice was negative.

Key words: human dental pulp mesenchymal stem cells; tumorigenicity; NOG mice; im injection

牙周炎是由菌斑刺激物引发的牙周组织炎症, 可引起牙周支持组织丧失, 牙齿松动甚至脱落, 其所造成的牙周组织缺损很难进行修复与再生重建。人牙髓间充质干细胞(human dental pulp

mesenchymal stem cells, HDP-MSCs)为牙周组织的再生产物之一, 具有自我更新、多向分化潜能和免疫调节能力, 有较好的再生和修复能力^[1-4], 可以通过注射方式直接在牙周缺损内提供大量具有多向

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

第一作者: 荆宝琴(1983—), 副研究员, 主要从事药理毒理学研究。Tel: (022)84845264 E-mail: jingbq@tjipr.com

*通信作者: 张金晓, 研究员。Tel: (022)84845058 E-mail: zhangjx@tjipr.com

杨月峰, 副研究员。Tel: (010)83816501 E-mail: yangyhje@163.com

分化潜能和免疫调节能力的HDP-MSCs,进而发挥再生局部软硬组织、抗炎等作用,可为临床慢性牙周疾病提供更加有效、安全的治疗方法和途径,具有良好的发展前景。

考虑到HDP-MSCs的多向分化特点和增殖能力,在临床前安全性评价中需对其致瘤性风险进行评估。NOG小鼠为重度免疫缺陷小鼠^[5],可以减少人源细胞给予动物时可能出现的免疫应答反应,常用于人源细胞产品的临床前安全性评价研究,本研究主要通过NOG小鼠的体内致瘤性试验来评价HDP-MSCs可能存在的致瘤风险,以评价其临床使用时的安全性。

1 材料

1.1 药物

HDP-MSCs(北京三有利和泽生物科技有限公司,批号01012012110701D-P6、01012012111304D-P6、01012012110205D-P6,规格 5×10^6 cells/1.5 mL/支);空白对照:氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号1812030510、D190628052)。

1.2 实验动物

SPF级NOG小鼠80只,全雌性,5~6周龄,体质量13.0~17.0 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号SCXK(京)2016-0006,动物来源:日本IVS公司。动物在天津天诚新药评价有限公司SPF级动物房内饲养,动物使用许可证号SYXK(津)2016-0009。每笼不多于5只,自由饮水摄食,喂饲免疫缺陷鼠专用饲料及无菌饮用水。饲养室温度20~26℃,湿度40%~70%,光照12 h明/12 h暗交替。

1.3 主要仪器

E1200-1电子天平,常熟市双杰测试仪器厂;0~150 mm数显式游标卡尺,世达工具(上海)有限公司;Siemens Healthcare Diagnostics Inc.BX51显微镜,日本奥林巴斯光学株式会社。

2 方法^[6]

2.1 分组与剂量设计

80只动物随机分为4组,每组20只,全雌性,分别为空白对照和HDP-MSCs低、中、高剂量组(2×10^6 、 5×10^6 和 2×10^7 cells/kg),分别为临床拟用剂量(1.7×10^5 cells/kg)的12、30、120倍。

2.2 给药方法及检查指标

双后肢交替im给药,每周给药1次,共给药6个月(27次),末次给药后次日剖杀;给药体积为2 mL/kg。试验期间每日进行1次大体观察、每周进行1次体

质量检查和肿瘤触诊,末次给药后次日进行1次解剖检查、脏器统计和组织病理学检查。

肉眼观察和手诊结合检查小鼠全身体表和皮下是否有肿块,确定肿块的位置,判断肿块质地、肿块与皮下的结合程度,并测量肿块的大小。

动物剖检后对动物进行体表及皮下检查、颈部检查、胸腔及胸腔脏器检查、盆腔及盆腔脏器检查、腹腔及腹腔脏器检查、头部检查、淋巴检查、乳腺、脊髓、坐骨神经检查等。对脑、脊髓、心脏、主动脉、肺脏、气管、食管、肝脏、肾脏(双侧)、脾脏、胆囊、胰腺、唾液腺(双侧)、肠系膜淋巴结、脑垂体、甲状腺(双侧)、甲状旁腺(双侧)、肾上腺(双侧)、乳腺、子宫、宫颈、卵巢(双侧)、输卵管(双侧)、阴道、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、膀胱、坐骨神经、皮肤、骨骼肌、腹股沟淋巴结、眼球(双侧)、哈氏腺(双侧)、骨髓(胸骨)、股骨、注射部位肌肉及异常组织(肿块)HE染色后进行组织病理学检查;并称量心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑脏、肾上腺、胸腺、子宫和卵巢脏器质量,计算脏器质量和脏体系数。

脏体系数=湿质量 \times 1 000/体质量

2.3 统计方法

使用SPSS 25.0软件进行数据统计,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析或非参数检验,各组与对照组进行差异性比较,评价时考虑统计学差异和生物学意义。临床观察、肿瘤触诊、大体解剖和组织病理学检查采用文字、表格或半定量描述观察到的各项异常反应或变化。

3 结果

3.1 大体观察

试验期间对照组死亡2只动物,分别于给药105、161 d死亡,其中1只触诊时发现肿块。HDP-MSCs低剂量组2只动物出现异常,其中1只自给药100 d逐渐出现活动减少、消瘦、弓背,给药112 d死亡;另1只动物给药174 d出现弓背,至给药184 d恢复正常。中剂量组1只动物自给药100 d逐渐出现活动减少、消瘦等现象,给药112 d按濒死动物处理。对照组及HDP-MSCs低、中剂量组其余动物及高剂量组所有动物试验期间均未见明显异常。

3.2 体质量

各剂量小鼠平均体质量与对照组比较未见明显异常。见图1。

3.3 肿瘤触诊

对照组1只动物给药84 d颈背侧出现肿块(活动度差,质硬),随着给药次数的增加肿块大小明显

增加,至给药 105 d 肿块大小为 16 mm×16 mm; HDP-MSCs 低、中、高剂量组试验期间肿瘤触诊中未见任何肿块。

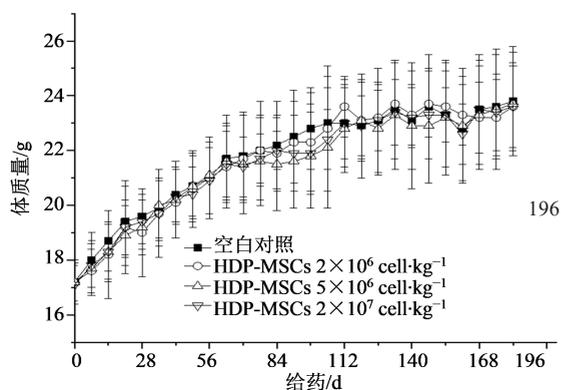


图1 体质量曲线
Fig.1 Body weight

3.4 解剖检查

3.4.1 给药结束剖杀 对照组1只动物右侧肾脏较小。HDP-MSCs低剂量组2只动物胸腺处均发现肿块,质韧,其中1只动物肿块与胸骨、心脏黏连,脾脏、子宫较大,胸骨骨髓呈白色。其他各只动物剖检中各被检脏器组织均未见肉眼可见的病理改变。

3.4.2 濒死及死亡动物 对照组2只,其中1只颈部背侧皮下见1肿块,右肾下极见多个白色突起,另1只胸腺处可见1肿块,质中,无薄膜;HDP-MSCs低剂量组1只动物未见明显肉眼可见病变;中剂量组1只动物胸腺处可见一肿块,质中,无包膜,双侧卵巢较大。

3.5 脏器质量和系数

各剂量组小鼠脏器质量及脏体系数与对照组比较均未见明显差异,见表1。

表1 脏器质量及系数($\bar{x}\pm s$)

Table1 Viscera weight and coefficient ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (cell·kg ⁻¹)	脏器质量/g				脏体系数/(mg·g ⁻¹)			
		心	肝	脾	肾	心	肝	脾	肾
对照	—	0.140±0.020	1.157±0.140	0.029±0.011	0.283±0.030	5.859±0.550	48.537±4.134	1.223±0.448	11.870±0.966
HDP-MSCs	2×10 ⁶	0.142±0.017	1.219±0.474	0.048±0.072	0.286±0.020	6.001±0.653	52.660±26.430	2.206±3.755	12.117±0.803
	5×10 ⁶	0.144±0.015	1.179±0.217	0.033±0.023	0.281±0.029	6.081±0.613	49.733±8.544	1.380±0.970	11.875±1.038
	2×10 ⁷	0.148±0.016	1.157±0.123	0.031±0.008	0.279±0.023	6.276±0.606	49.105±5.036	1.328±0.340	11.811±0.718

组别	剂量/ (cell·kg ⁻¹)	脏器质量/g				脏体系数/(mg·g ⁻¹)			
		脑	肾上腺	子宫	卵巢	脑	肾上腺	子宫	卵巢
对照	—	0.488±0.078	0.009±0.002	0.149±0.049	0.028±0.005	20.536±3.227	0.383±0.079	6.320±2.252	1.174±0.183
HDP-MSCs	2×10 ⁶	0.463±0.024	0.009±0.003	0.166±0.059	0.030±0.007	19.658±1.297	0.396±0.120	7.078±2.730	1.256±0.295
	5×10 ⁶	0.473±0.024	0.009±0.003	0.134±0.050	0.030±0.009	20.031±1.530	0.388±0.087	5.695±2.102	1.275±0.407
	2×10 ⁷	0.468±0.026	0.009±0.002	0.134±0.035	0.029±0.006	19.864±1.053	0.373±0.073	5.675±1.444	1.243±0.227

3.6 组织病理学检查

3.6.1 给药结束剖杀动物 非肿瘤性病变:对照组和HDP-MSCs低、中、高剂量组较多动物肾上腺被膜下细胞增生,个别动物脾脏见骨化生、肾脏体积减小、肾小管管型、肾小管再生、肾脏间质炎细胞浸润、子宫息肉、子宫腺囊肿,上述病变在各组的发生率没有明显差异,根据文献资料^[7]、病变性质和发病情况分析上述组织学改变与供试品无关,而是动物背景性病变。另外HDP-MSCs低剂量组1例给药部位骨骼肌纤维坏死伴感染(此例动物发生胸腺淋巴瘤伴多脏器转移),该只动物病变与供试品直接毒性无关。

肿瘤性病变:对照组有1例肺脏支气管-肺泡腺瘤(良性),属于动物背景性病变;HDP-MSCs低剂量组2例胸腺淋巴瘤(恶性),对照组和中剂量组各有1例胸腺淋巴瘤(恶性),结合文献报道^[8],NOG小鼠常自发胸腺淋巴瘤,因此本实验各组发生的胸腺淋巴瘤应属动物背景性病变,与供试品无关。

3.6.2 试验期间濒死死亡动物 对照组1只动物头颈部见皮下肿瘤(恶性)伴肾脏坏死感染,另1只见胸腺淋巴瘤(恶性)且伴心、肝、肺、肾等多脏器转移。HDP-MSCs中剂量组1只动物见胸腺淋巴瘤(恶性)伴多脏器转移,低剂量组1只动物肾脏重度病变,双侧肾脏多处坏死、化脓、感染。见图2。

3.6.3 肿瘤发生率分析 胸腺淋巴瘤发生率在对照组为1/20, HDP-MSCs高剂量组0/20,中剂量组1/20,低剂量组2/20;皮下恶性肿瘤发生率在对照组为1/20,高、中、低剂量组均为0/20;肺脏支气管-肺泡腺瘤发生率在对照组为1/20,高、中、低剂量组均为0/20。上述肿瘤的发生率较低,与对照组比较,高、中、低剂量组的发生率未见明显差异,与供试品无关。

4 讨论

近年来,针对牙周病的修复与再生重建问题,干细胞治疗方法应运而生并取得不错的治疗效果。HDP-MSCs是一类独特的外胚层神经嵴来源的成

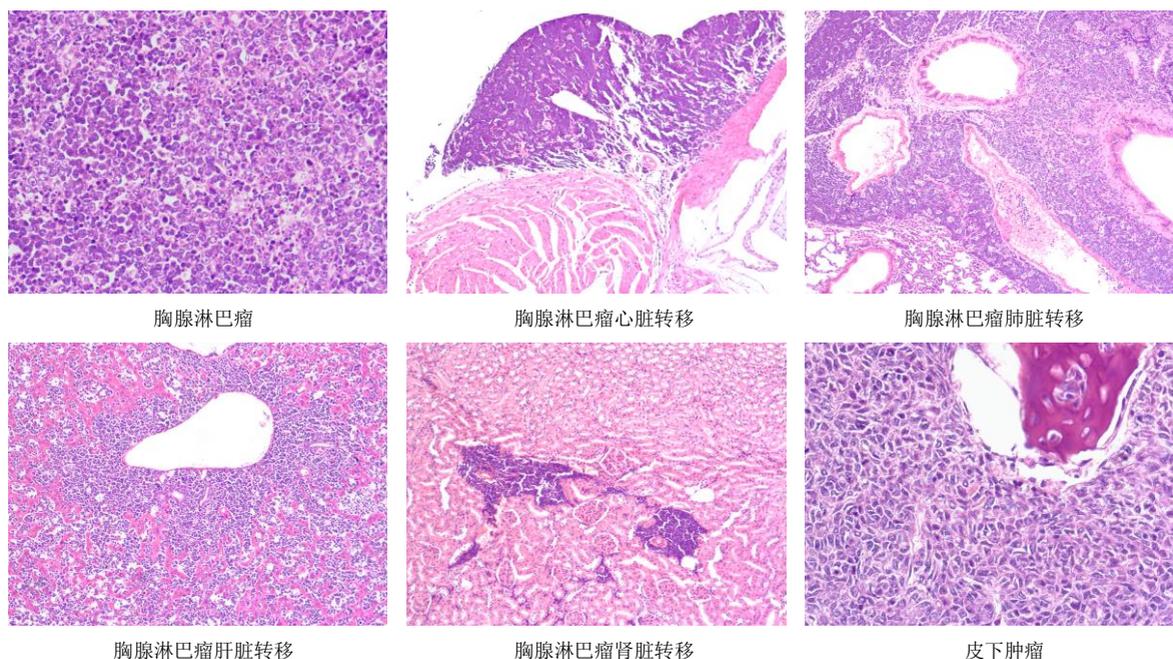


图2 胸腺淋巴瘤组织病理学检查(胸腺淋巴瘤和皮下肿瘤为 $\times 40$,其他为 $\times 10$)

Fig. 2 Histopathological examination of thymic lymphoma ($\times 40$ for thymic lymphoma and subcutaneous tumor, and $\times 10$ for others)

体干细胞群,可以通过注射方式直接在牙周缺损内提供大量具有多向分化潜能和免疫调节能力的HDP-MSCs,为临床慢性牙周炎的治疗提供牙周再生效果明确、应用安全的药物。由于干细胞的多向分化特点和增殖能力,在临床前安全性评价中需对其致癌性风险进行评估。

在评价干细胞临床前致癌性风险时,首先需要选择合适的动物模型进行致瘤实验,动物种属应能对药物产生与人体类似的生物学反应,需考虑该种属动物与人体在生理和解剖学上的相似性、对于人干细胞制剂是否产生免疫排斥、是否可以使用临床拟用的给药方式。NOG小鼠为重度免疫缺陷小鼠,常用于人源细胞产品的临床前安全性评价研究,可以减少人源细胞给予动物时可能出现的免疫应答反应。由于生产单位仅销售单性别雌性动物,因此本实验所有动物均为雌性。给药方式拟用临床给药方式即im给药,考虑小鼠给药的可操作性,选用后肢im给药。

在进行干细胞的致瘤性评价时,应重点关注供试品对动物肿瘤病变的影响,应对肿瘤病变的原因作出合理分析及判断,尤其注意区分动物的自身病变和供试品所致的病变。本试验中NOG小鼠出现了多种肿瘤病变,包括胸腺淋巴瘤伴多脏器转移、肺脏支气管-肺泡腺瘤、肾小管管型、肾小管再生等,

分析各组动物肿瘤病变的发生情况,同时比较试验组与对照的肿瘤发生率,可判定上述肿瘤病变均为自发性背景病变,与供试品无关。HDP-MSCs在本试验剂量下致瘤试验结果为阴性,表明在临床使用时安全性较高。

参考文献

- [1] 乔朋艳,刘洪臣.人牙髓干细胞的生物学特性研究及其应用进展[J].口腔颌面修复学杂志,2018,19(6):352-357.
- [2] 耿亚伟,刘明月,张震,等.牙髓干细胞在牙齿再生医学中的应用[J].现代口腔医学杂志,2016,30(2):114-117.
- [3] 刘尧.PD-1维持人牙髓间充质干细胞生物学性能及相关调控机制的研究[D].沈阳:中国医科大学,2018.
- [4] 马子洋,郭晓霞.牙髓干细胞在再生医学中的应用研究与进展[J].中国组织工程研究,2016,20(19):2872-2878.
- [5] 路杰,崔凌凌.人源化小鼠模型研究及应用进展[J].医学综述,2014,20(18):3281-3284.
- [6] 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[S].2017.
- [7] Kasahara K, Fukunaga Y, Igura S, et al. Background data on NOD/Shi-scid IL-2R γ null mice (NOG mice) [J]. J Toxicol Sci, 2017, 42(6): 689-705.
- [8] Yasuda M, Ogura T, Goto T, et al. Incidence of spontaneous lymphomas in non-experimental NOD/Shi-scid, IL-2R γ ^{null}(NOG) mice [J]. Exp Anim Tokyo, 2017, 66(4): 425-435.