

人脐带间充质干细胞在3种不同培养体系中的生长状况及腺病毒感染效率*☆

洪敬欣¹, 张茜真^{2,3}, 韩俊领^{1,4}, 刘辉², 刘剑¹, 邱录贵^{1,4}

Growth state and adenovirus infection efficiency of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in 3 different culture systems

Hong Jing-xin¹, Zhang Qian-zhen^{2,3}, Han Jun-ling^{1,4}, Liu Hui², Liu Jian¹, Qiu Lu-gui^{1,4}

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* culture condition and culture efficiency are different in reported umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, and lacked of unified standards. Different derived mesenchymal stem cells have different biological properties. Therefore, it is very necessary to establish a simple and high-performance culture system for umbilical cord-derived mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To observe the growth state of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in different culture systems *in vitro* and adenovirus infection efficiency.

METHODS: Mesenchymal stem cells were separated from healthy full-term delivery fetus using collagenase digestion method and purified by adherent culture. These cells were cultured and amplified in DMEM (low glucose), MesenPRO RSTM Medium and STEMPRO[®] MSC SFM *in vitro*. The 3-5 passage mesenchymal stem cells were infected by the Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP as multiplicity of infection (MOI)=1, 10, 100. Viral infection and green fluorescence expression were observed at post-infection 24, 56 and 72 hours using inverted fluorescence microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The cell morphology in STEMPRO[®] MSC SFM was different from other two culture system and these cells were not easy to adhere after trypsin digestion. Cell doubling time in the MesenPRO RSTM Medium was shorter than other two groups. Mesenchymal stem cells were infected by Ad5/35-EGFP with higher efficiency than other two kinds of adenovirus, but part of cells appeared apoptosis. The infection efficiency of Ad5/11-EGFP was highest. The fluorescence intensity was gradually increased with increased MOI.

Hong JX, Zhang QZ, Han JL, Liu H, Liu J, Qiu LG. Growth state and adenovirus infection efficiency of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in 3 different culture systems. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(1): 42-47. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前所报道的脐带间充质干细胞体外培养条件及培养效率不尽相同, 尚缺乏统一标准。而且由于不同来源的间充质干细胞生物学特征尚有一定差异, 因此建立脐带间充质干细胞简便、高效的培养体系十分必要。

目的: 观察人脐带来源的间充质干细胞在体外不同培养体系中的生长状态, 以及不同腺病毒感染的效率。

方法: 采用胶原酶消化法从正常足月新生儿脐带中分离出间充质干细胞, 贴壁法纯化培养, 细胞贴壁后利用低糖 DMEM, MesenPRO RSTM Medium 和 STEMPRO[®] MSC SFM 这 3 种培养体系进行体外扩增。取对数生长期的第 3~5 脐带间充质干细胞, 应用腺病毒 Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP 分别以感染复数=1, 10, 100 进行感染, 分别于感染后 24, 56, 72 h 倒置荧光显微镜观察病毒感染及绿色荧光表达情况。

结果与结论: 使用低糖 DMEM 培养的细胞初期融合时间长, STEMPRO[®] MSC SFM 培养的细胞虽然连接紧密, 但消化传代后不易贴壁, 而 MesenPRO RSTM Medium 培养的细胞在相同时间内能达到较高的细胞密度, 更适于脐带间充质干细胞的体外扩增。Ad5/35-EGFP 感染脐带间充质干细胞的效率明显高于其他两种腺病毒, 但可导致细胞凋亡; 腺病毒 Ad5/11-EGFP 对脐带间充质干细胞的感染效率较佳, 随着感染复数的升高, 所表达的荧光强度也逐渐增大。

关键词: 培养体系; 腺病毒; 感染效率; 脐带间充质干细胞; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.01.010

洪敬欣, 张茜真, 韩俊领, 刘辉, 刘剑, 邱录贵. 人脐带间充质干细胞在 3 种不同培养体系中的生长状况及腺病毒感染效率[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(1):42-47. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脐带富含造血、间充质、神经及内皮等多种干/祖细胞, 与骨髓来源的间充质干细胞相比较, 人脐带来源间充质干细胞的优势在于收集过程相对简单、无创、胎盘屏障使脐带受病毒与细菌污染少、脐血免疫系统的原始性降低了移植后受体发生排斥反应的概率^[1-9]。脐带间充

质干细胞呈成纤维细胞形态, 在不同的诱导条件下能够向脂肪、骨、软骨方向分化。在体外培养体系中能快速增殖, 传代后 3~5 d 能增殖四五倍, 传代培养 10 代以上细胞可增加 5~10 倍, 且增殖速度无明显降低, 传代稳定^[10]。

实验通过体外培养的方法将脐带间充质干细胞分离、扩增, 观察其生物学特性、表型特征等, 建立稳定的体外培养体系, 用 Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP 这

¹Union Stem Cell & Gene Engineering Co.,Ltd., Tianjin Cord Blood Bank, Tianjin 300384, China; ²Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China; ³Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China; ⁴Institute of Hematology, Blood Disease Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

Hong Jing-xin^{*}, Ph.D., Assistant researcher, Union Stem Cell & Gene Engineering Co.,Ltd., Tianjin Cord Blood Bank, Tianjin 300384, China
hjx78@126.com

Correspondence to: Qiu Lu-gui, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Union Stem Cell & Gene Engineering Co.,Ltd., Tianjin Cord Blood Bank, Tianjin 300384, China; Institute of Hematology, Blood Disease Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China
drqiu99@medmail.com.cn

Supported by: Special Fund for Scientific and Technological Innovation of Tianjin City, No. 08 FDZSH03000*

Received: 2009-09-03
Accepted: 2009-12-03

¹ 协和干细胞基因工程有限公司, 天津市脐带造血干细胞库, 天津市300384; ² 解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海市200438; ³ 浙江理工大学生命科学与生物技术研究所, 浙江省杭州市310018; ⁴ 中国医学科学院, 北京协和医学院, 血液学研究所, 血液病医院, 天津市300020

洪敬欣☆, 女, 1978年生, 天津市人, 汉族, 2007年天津医科大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事血液学及干细胞方面的研究。
hjjx78@126.com

通讯作者: 邱录贵, 主任, 主任医师, 教授, 博士生导师, 协和干细胞基因工程有限公司, 天津市脐带造血干细胞库, 天津市300384; 中国医学科学院, 北京协和医学院, 血液学研究所, 血液病医院, 天津市300020
drqiu99@medmail.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)01-00042-06

收稿日期: 2009-09-03
修回日期: 2009-12-03
(20090903015/ZS-Q)

3种腺病毒载体将EGFP基因体外转染脐带间充质干细胞, 观察EGFP在脐带间充质干细胞中能否有效表达, 以及病毒对脐带间充质干细胞基本生物学特性的影响, 从而为腺病毒能否作为脐带间充质干细胞的基因转移与表达载体进行细胞治疗和基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 于2009-01/08在协和干细胞基因工程有限公司和解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室完成。

材料: 经产妇知情同意, 采集足月剖宫产健康胎儿脐带8份, 实验经上海市长海医院伦理委员会批准。脐带采集之前产妇产需做艾滋病病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、谷丙转氨酶、支原体等检测, 全部合格以确保安全性后方可采集, 采集后4℃保存, 6 h之内处理。3种腺病毒载体Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP由解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室提供。

实验用主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
DMEM/F12 培养液、低糖 DMEM、MesenPRO RS™ Medium、STEMPRO® MSC SFM、TrypLE™ Select	GIBCO Inc., USA
胎牛血清	PAA, Austria
恒温 CO ₂ 孵箱	Thermo SCIENTIFIC, USA
倒置生物显微镜	LEICA DMI3000B, USA; Nikon ECLIPSE TE300, Japan
生物显微镜	XSP-17C

实验方法:

脐带间充质干细胞的分离: 脐带自手术台取下后, 浸入含抗生素的生理盐水中, 4℃保存, 在操净台内取出脐带, 用D-PBS冲洗净脐动脉和脐静脉内的残余血液, 用止血钳和剪刀剔除上述血管, 将脐带剪成1 mm³大小的组织块后放入200 mL蓝盖试剂瓶, 加入质量/体积比为0.1%的II型胶原酶30 mL, 置于恒温振荡仪内持续消化6 h, 100目筛网过滤收集细胞。加入

D-Hank's液冲洗细胞3次, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12重悬细胞, 调整细胞密度为(4.8×10³~1×10⁴)/cm², 接种于6孔板内, 于37℃、体积分数为5%的CO₂孵箱内培养, 24 h后换液。

脐带间充质干细胞在不同培养体系中的体外扩增: 待原代培养的脐带间充质干细胞贴壁后, 在两个6孔板中进行3种培养体系的生长对比实验。第1个6孔板中细胞密度为1×10⁷ L⁻¹, 采用连续适应法使细胞由原代培养时使用的DMEM/F12分别逐步过渡到低糖DMEM、MesenPRO RS™ Medium和STEMPRO® MSC SFM 3种培养体系, 即用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基和相应的3种培养基按体积比1:1混合培养细胞, 通过下列混合培养基的方式, 连续几代减少当前培养基的量, 即1:2, 1:4, 1:16和100%替代培养基, 每次适应改变培养体系时, 传代细胞一两次, 其中孔1为原代培养时的DMEM/F12培养液, 孔2为低糖DMEM, 孔3为MesenPRO RS™ Medium, 孔4为STEMPRO® MSC SFM。第2个6孔板中细胞密度为2×10⁷ L⁻¹, 每孔培养液设置同上, 目的是避免在不同时间消化传代间充质干细胞时出现实验操作上的误差。

脐带间充质干细胞的不同腺病毒感染: 实验感染复数=病毒载体的感染单位数/转染细胞总数。按上述方法取对数生长期的脐带间充质干细胞, 计数后铺24孔板, 接种密度为5×10⁴/孔, 于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱培养24 h后全量更换不含血清的培养基。用该培养基将Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP病毒原液稀释成不同感染复数的病毒悬液, 分别以感染复数为1, 10, 100加入病毒液到细胞中, 十字法混匀, 37℃感染2 h, 每隔20 min轻轻晃动培养板1次, 使病毒颗粒在培养液内均匀分布, 感染结束后弃去感染上清, 用不含血清的培养液清洗细胞2遍, 加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液, 于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱继续培养。分别于感染后24, 56, 72 h用荧光倒置显微镜观察不同感染复数孔的病毒感染效果及绿色荧光表达情况。

主要观察指标: ①脐带间充质干细胞在3种培养体系中的生长状况。②3种携带绿色荧光的腺病毒载体以不同感染复数感染脐带间充质干细胞的效果。

设计、实施、评估者: 设计为第一、三作者, 资料收集为第一、二作者, 实施、评估为第一、六作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

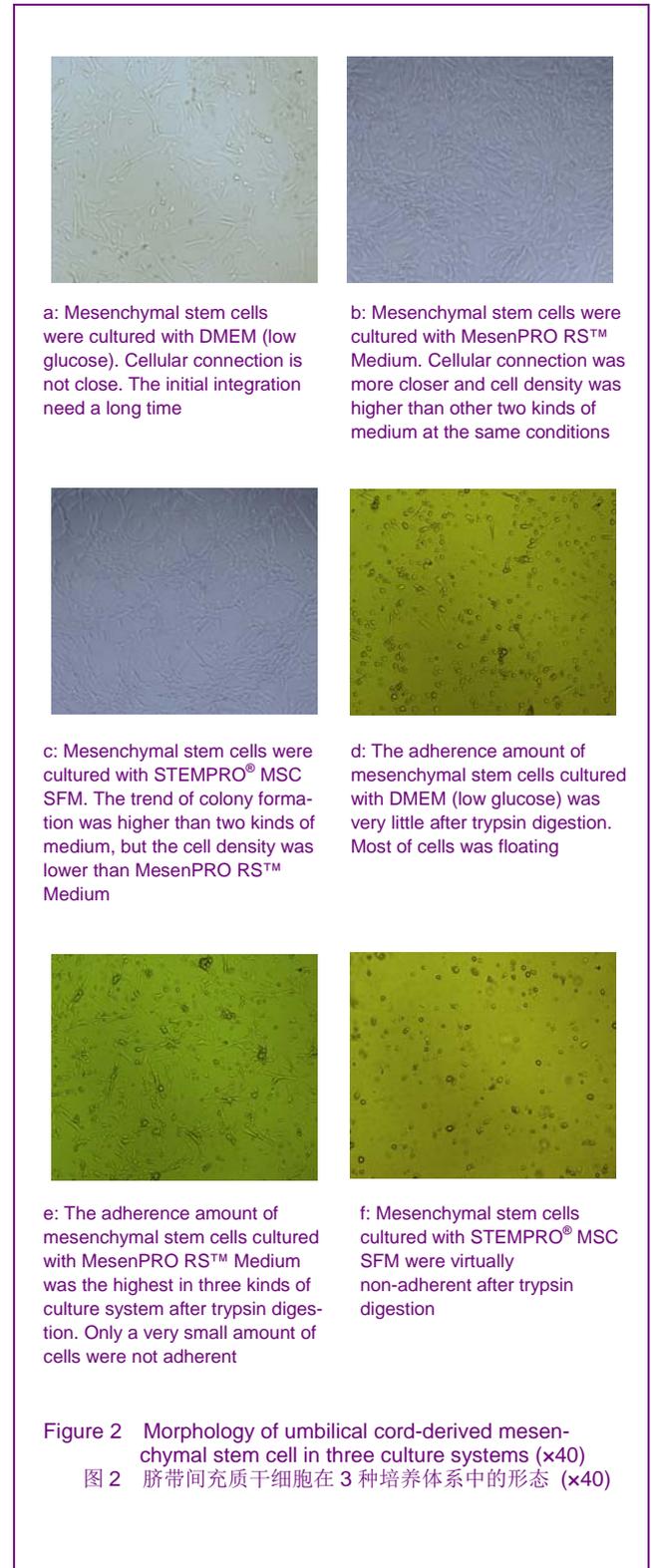
2 结果

2.1 脐带间充质干细胞的原代培养 原代脐带间充质干细胞接种24 h后全量更换新的DMEM/F12培养液, 除去未贴壁细胞, 倒置显微镜下可见有少量形态各异的贴壁细胞, 见图1a。3~7 d后形成散在的细胞集落, 大部分是长梭形的成纤维样细胞, 细胞折光性好, 见图1b。原代培养的细胞增殖能力旺盛, 再经过1周即可达80%~90%融合, 见图1c。用胰酶消化传代后, 可得到较为纯化的间充质干细胞, 多数呈旋涡状生长, 传代后的细胞形态无明显变化, 性质稳定^[11]。细胞经过1 d左右的潜伏适应期, 第二三天大量增殖, 然后进入对数增殖期, 大约持续六七天^[12], 七八天后可达到100%融合, 见图1d。



2.2 脐带间充质干细胞在3种培养体系中的生长情况 从细胞形态上观察, 使用低糖DMEM培养的间充质干细胞初期融合时间长, 而MesenPRO RS™ Medium和STEMPRO® MSC SFM培养的间充质干细胞连接紧密。使用MesenPRO RS™ Medium培养的间充质干细胞在

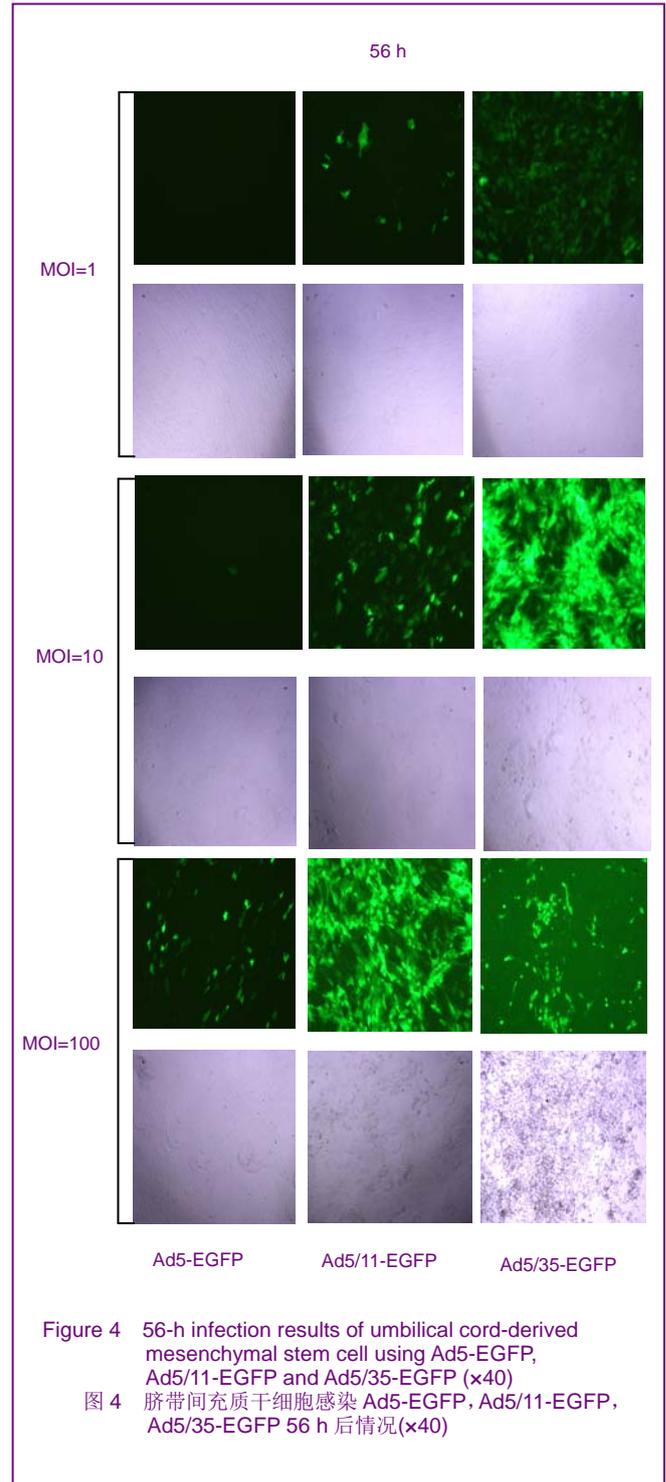
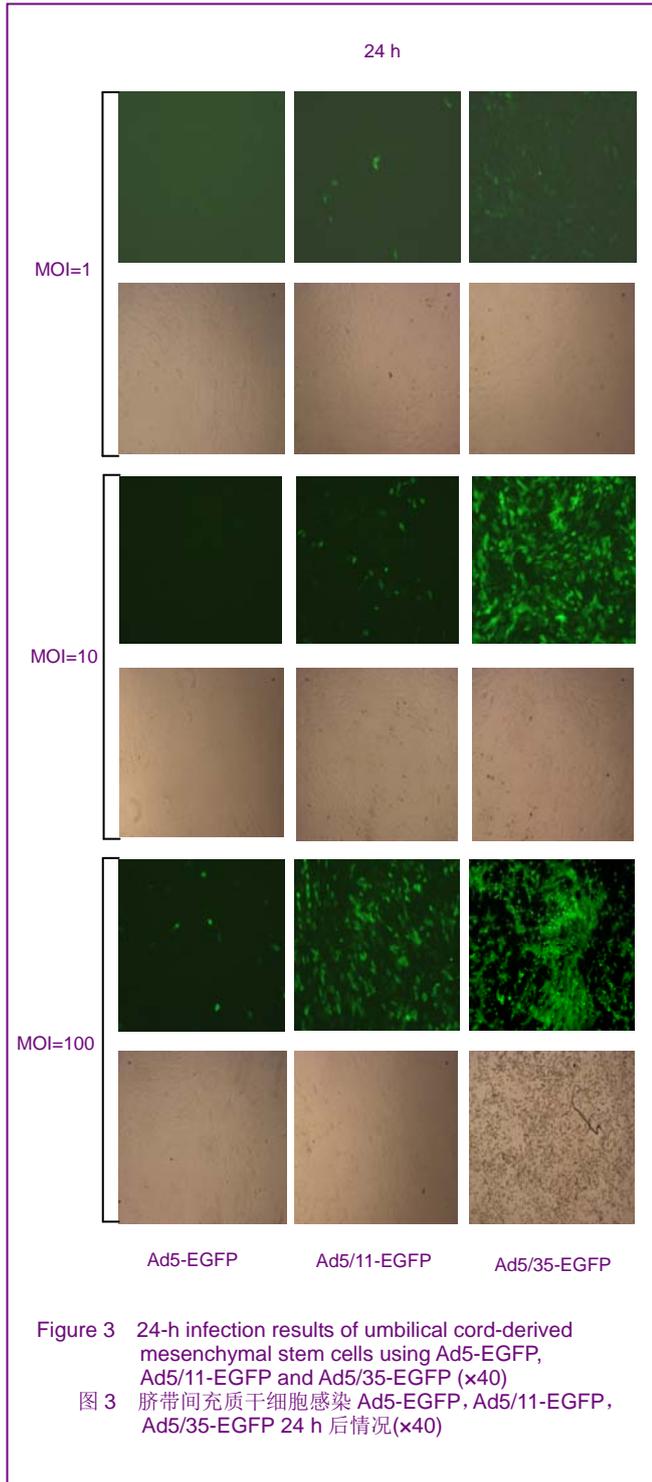
相同时间内能达到较高的细胞密度, 使用STEMPRO® MSC SFM培养的间充质干细胞形成集落的趋势强于另2种培养体系, 见图2a, b, c。由于缺少血清的促贴壁效应, 使用STEMPRO® MSC SFM培养的传代细胞较另2种培养体系不易贴壁, 低糖DMEM培养的细胞消化后贴壁数量也很少, 见图2d, e, f。

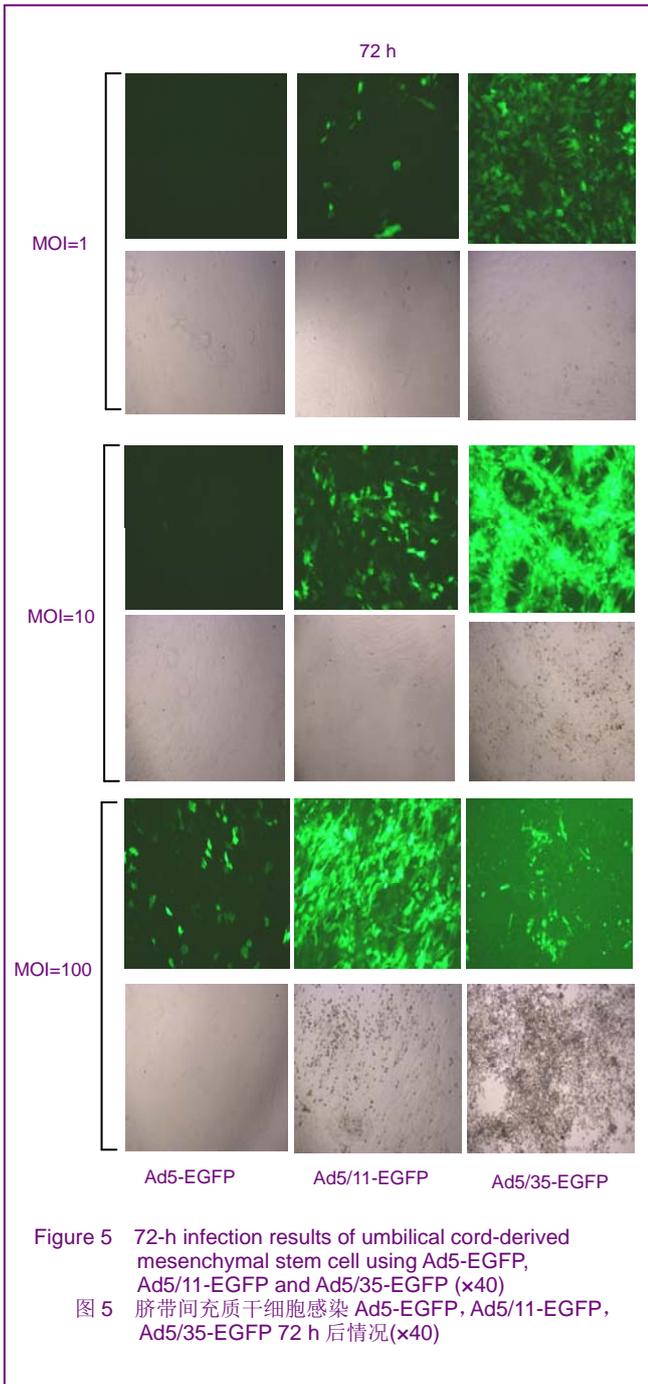


2.3 脐带间充质干细胞的腺病毒感染效果 在3种腺病毒Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP中, 以Ad5/11-EGFP对脐带间充质干细胞的感染效率较佳, 随着感染复数的升高, 所表达的荧光强度也逐渐增大; Ad5-EGFP 感染能力明显低于 Ad5/11-EGFP 和 Ad5/35-EGFP, 在感染复数=100时荧光阳性细胞率也仅为30%。

在每一种腺病毒中, 感染效率随着感染复数值的增

加而增高, 但随着感染时间的延长病毒携带的绿色荧光强度会相应减弱, 细胞出现凋亡现象, 病毒感染24 h后情况见图3, 感染56 h后情况见图4, 感染72 h后情况见图5。病毒感染72 h时, 脐带间充质干细胞部分出现胞体皱缩、肿胀、空泡样变甚至脱落等细胞病变效应, 感染复数=100病毒感染的脐带间充质干细胞增殖能力显著降低、死细胞比例显著增多, 而低于此滴度的病毒对细胞活力与增殖能力无明显影响。





3 讨论

间充质干细胞来源广泛, 存在于多种组织中, 其中尤以脐带间充质干细胞更为原始, 分化能力更强, 且其来源于胚胎组织免疫原性更低^[13]。实验成功从人脐带中分离出间充质干细胞, 获得的原代细胞能够在24~48 h 贴壁。连续传代本身就是细胞纯化的过程, 由于间充质干细胞的增殖优势, 血细胞和内皮细胞随着传代培养而被剔除, 经过2次传代培养其形态呈较为均一的梭形或纤维细胞, 漩涡样生长, 同时细胞进入指数生长阶段, 最终细胞扩增达 10^9 以上, 为干细胞临床和实验研究提

供了大量的间充质干细胞来源。

目前美国国家食品药品监督管理局已经批准间充质干细胞输注进入II期临床试验, 以期减轻异基因骨髓移植中的移植物抗宿主反应。有关间充质干细胞体外培养体系标准化以及体内植入存活及分化潜能等, 仍需要通过严谨的实验进一步阐明。但由于初始接种细胞成分不同, 培养体系组成的差异诸如血清浓度及血清种类以及生长因子的添加与否及添加成分等, 这些均可影响最终细胞产品的纯度和具体功能。目前所报道的脐带间充质干细胞体外培养条件及培养效率不尽相同, 尚缺乏统一标准。而且由于不同来源的间充质干细胞生物学特征尚有一定差异, 因此建立脐带间充质干细胞简便、高效的培养体系十分必要。查阅大量国内外文献, 用于脐带间充质干细胞体外培养的体系包括低糖DMEM、DMEM/F12、间充质干细胞basal medium和无血清培养体系。其中DMEM/F12是由DMEM培养基和F12培养基按1:1混合组成的, 其营养成分丰富, 且可以使用较少血清, 或作为无血清培养基的基础培养基, 适于原代细胞的培养。因此实验选择DMEM/F12培养液用于脐带间充质干细胞的原代培养, 选择低糖DMEM、MesenPRO RSTM Medium和STEMPRO[®] MSC SFM3种培养体系进行脐带间充质干细胞生长增殖的对比实验。实验结果表明, MesenPRO RSTM Medium是最适合于脐带间充质干细胞在体外扩增的培养体系, 因为在细胞的贴壁、传代、复苏及冻存过程中, 该培养体系均能够获得形态均一的细胞和较高的增殖率。从另外一个角度考虑, 由于在培养体系中添加了动物成分的胎牛血清, 它含有补体成分, 如果移植输注给患者时可能会导致患者的不良反应。无血清培养是用已知人源或动物来源的蛋白或激素代替动物血清的一种细胞培养方式, 它能减少后期纯化工作, 提高产品质量, 因此考虑是否可以使用该体系获得稳定均一的细胞。但实验结果表明该体系缺少血清中促贴壁的固有成分, 细胞传代后几乎是不贴壁的, 必须加入明胶等基质促进细胞贴壁, 可是这又无形中增加了生产的成本。因此, 无论从细胞培养角度还是从产业化角度看, MesenPRO RSTM Medium是理想的培养体系。

近年来为更好地将间充质干细胞应用于基因治疗, 学者们一直在寻找对间充质干细胞损害小, 而外源基因转移效率和表达水平高的基因转移载体。由于腺病毒载体转导目的基因高效率、低致病性、高滴度以及在体内不整合入宿主细胞染色体等优点, 腺病毒载体已被认为是最为有效的转基因载体之一, 并广泛运用于人类基因治疗。病毒介导的基因高效转移与表达的先决条件是病毒载体与靶细胞表面受体的高效结合。一些肿瘤细胞^[14]、造血祖细胞和间充质干细胞不表达或低水平表达这些受体^[15]。人类腺病毒家族有51个已知血清型, 分为6个亚属。常规的5型腺病毒载体属于C组腺病毒, 它是基因

治疗中应用最多的、安全性较好的亚属^[16-17], 但研究表明5型腺病毒对部分细胞的感染效率低下, 这可能与这些细胞不能有效表达受体有关^[18]。人11型、35型腺病毒同属于B亚群, 受体均为CD46, 腺病毒通过其纤毛蛋白与细胞表面的CD46膜蛋白的结合黏附并进入细胞^[19]。用11型和35型腺病毒的fiber替代5型腺病毒的fiber, 形成嵌合载体, 改变Ad5原有的感染吸受体, 因此Ad5/11型和Ad5/35型对人的大多数细胞具有良好的转导效率。实验结果也发现Ad5的感染效率明显低于Ad5/11和Ad5/35。另一方面由于EGFP对细胞有一定的毒性, 而且随着EGFP表达量的增加其对细胞的毒性也会加剧, 因此在感染后一段时间内出现了部分细胞死亡的现象。感染72 h后, 脐带间充质干细胞无法正常繁殖, 细胞也出现凋亡。

总之, 间充质干细胞的多系分化能力、免疫调节作用及易于体外分离培养扩增操作, 为其临床应用奠定了基础。然而在将来运用到临床的过程中, 一些问题仍需注意, 例如细胞在体外培养的标准化流程、植入细胞的存活率以及细胞固有的分化特性等问题。这些问题解决之后, 方可作为间充质干细胞相关细胞治疗或组织构建替代治疗找到合适的临床适应证^[20-21]。

4 参考文献

- Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32(1):8-15.
- Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab*. 2007;53(1-2): 81-84.
- Wachsmuth L, Söder S, Fan Z, et al. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):477-485.
- Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, et al. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2006;24(3): 679-685.
- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation*. 2004;72(7):319-326.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-98.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10344-10349.
- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(2):165-181.
- Shen H. *Zhongguo Meirong Yixue*. 2007;16(8): 1158-1160. 沈华. 脐带间充质干细胞的研究进展[J]. *中国美容医学*, 2007, 16(8): 1158-1160.
- Xue MS, Liu Y. *Zhongguo Meirong Yixue*. 2008;17(9): 1405-1407. 薛美思, 刘毅. 脐带间充质干细胞在细胞治疗中的研究进展[J]. *中国美容医学*, 2008, 17(9): 1405-1407.
- Ma L, Cui BL, Feng XY, et al. *Zhonghua Erke Zazhi*. 2006;44(7): 513-517. 马廉, 崔冰琳, 冯学永, 等. 人脐带间充质干细胞的生物学特性及向神经样细胞分化的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(7): 513-517.
- Shi DZ, Hu WX. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2006;10(17): 24-26. 史德志, 胡卫星. 脐带源间充质干细胞体外分离培养后形态学与表面抗原的鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2006, 10(17): 24-26.
- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392.
- Kanerva A, Hemminki A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer*. 2004;110(4): 475-480.
- Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, et al. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol Pharm*. 2006; 3(2): 95-103.
- Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, et al. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*. 2002;76(9): 4612-4620.
- Abbink P, Lemckert AA, Ewald BA, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*. 2007;81(9): 4654-4663.
- Yuko T, Larisa P, Joel N, et al. A Mosaic Fiber Adenovirus Serotype 5 Vector Containing Reovirus 1 and Adenovirus Serotype 3 Knob Fibers Increases Transduction in an Ovarian Cancer Ex vivo System via a Coxsackie and Adenovirus Receptor-Independent Pathway. *Cancer Res*. 2007;13: 2777-2783.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CIM6 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*. 2003;9(11): 1408-1412.
- Zuo ZH, Li H, Wu XX. *Zhongguo Bingduxue*. 2003;18(4): 344-347. 左泽华, 李辉, 伍欣星. pEGFP-HPV16 E7重组融合蛋白质粒的构建及其表达[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(4): 344-347.
- Zhang WW, Guo ZK. *Zhongguo Shiyan Xueyexue Zazhi*. 2007; 15(4): 901-904. 张薇薇, 郭子宽. 间充质干细胞临床试验中的问题及其解决策略[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(4): 901-904.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 天津市科技创新专项资金 (08 FDZDSH03000)。

利益冲突: 赞助情况不存在利益冲突。

课题的意义: 课题旨在体外大量扩增出脐带间充质干细胞, 因其易于基因转染, 有望用于疾病的基因治疗。带有某些基因的腺病毒感染间充质干细胞, 可为将来的临床治疗提供实验基础。

课题评估的“金标准”: 参照以往相关文献, 为观察脐带间充质干细胞在 3 种培养体系中的生长状况, 采用连续适应法使细胞由原代培养时使用的 DMEM/F12 分别逐步过渡到低糖 DMEM、MesenPRO RS™ Medium 和 STEMPRO® MSC SFM 3 种培养体系。另取对数生长期的脐带间充质干细胞, 铺板后分别以 Ad5-EGFP, Ad5/11-EGFP, Ad5/35-EGFP 腺病毒载体以不同感染复数感染脐带间充质干细胞。

课题的倚倚与不足: 脐带间充质干细胞在将来运用到临床的过程中, 一些问题仍需注意, 如细胞在体外培养的标准化流程、植入细胞的存活率以及细胞固有的分化特性等问题。

提供临床借鉴的价值: 脐带间充质干细胞来源丰富, 易达到标准化和商品化生产, 有望成为治疗肝硬化的药物。此外动物实验和临床试验证明, 间充质干细胞移植不仅对肝硬化治疗有效, 而且对心血管类疾病、神经损伤、糖尿病、骨损伤等均有一定疗效。