

体外模拟干细胞微环境培养扩增脐血及脐带基质源性间充质干细胞***

邱云, 郑青, 萧树东, 汪铮

Simulation of stem cell microenvironment *in vitro* to culture and expand cord and umbilical cord mesenchymal stem cells

Qiu Yun, Zheng Qing, Xiao Shu-dong, Wang Zheng

Department of Digestion Medicine, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, MED-X Renji Stem Cell Clinical Research Center, Shanghai 200001, China

Qiu Yun★, Studying for master's degree, Department of Digestion Medicine, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, MED-X Renji Stem Cell Clinical Research Center, Shanghai 200001, China

Corresponding author: Zheng Qing, M.D., Associate professor, Department of Digestion Medicine, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, MED-X Renji Stem Cell Clinical Research Center, Shanghai 200001, China qingzheng101@yahoo.com

Corresponding author: Wang Zheng, M.D., Associate professor, Department of Digestion Medicine, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, MED-X Renji Stem Cell Clinical Research Center, Shanghai 200001, China zheng.w.dr@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: The future of cell therapy requires high purity of mesenchymal stem cells (MSCs) in order to clearly determine the therapeutic dose and dose-response relationship. Establishing a robust amplification system *in vitro* to obtain the therapeutic dose of stem cells while preserving the characteristics of stem cells is the urgent of clinical laboratories.

OBJECTIVE: To simulate a microenvironment for stem cells *in vitro* to harvest and expand umbilical cord blood-derived and cord-derived MSCs and to compare with conventional two-dimensional culture system.

METHODS: The umbilical cord blood-derived and cord-derived MSCs were inoculated in the conventional two-dimensional plastic culture system and extracellular matrix, respectively. The two amplification systems for *in vitro* large-scale expansion of umbilical cord blood-derived and cord-derived MSCs were evaluated from the points of cell counts and surface markers.

RESULTS AND CONCLUSION: The production of umbilical cord blood-derived and cord-derived MSCs in the bone marrow-derived extracellular matrix culture system was 4-6 times of that in the conventional two-dimensional culture system. FACS analysis showed that extracellular matrix system better maintained the surface marker of stem cells. Therefore, such a three-dimensional culture system is much closer to physical environment than the two-dimensional culture system. The established bone marrow-derived extracellular matrix culture system can maintain the characteristics of mesenchymal stem cells, which provides access to more homogeneous MSCs of high activity within a short time period.

Qiu Y, Zheng Q, Xiao SD, Wang Z. Simulation of stem cell microenvironment *in vitro* to culture and expand cord and umbilical cord mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1756-1760. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 建立稳健的扩增体系, 在体外扩增时最大限度地获得治疗剂量的干细胞数, 同时保存干细胞的特性是临床实验室亟待解决的问题。

目的: 建立体外模拟干细胞微环境细胞外基质扩增脐血间充质干细胞及脐带间充质干细胞的方法, 并与传统的 2-D 培养体系比较。

方法: 建立体外模拟干细胞微环境细胞外基质, 体外分离脐血间充质干细胞及脐带间充质干细胞后分别接种到细胞外基质及传统的 2-D 塑料培养体系, 分别从细胞计数及细胞表面标志物的变化, 评估两种扩增体系对脐血间充质干细胞及脐带间充质干细胞体外扩增的优劣。

结果与结论: 使用骨髓源性的细胞外基质培养体系单位时间脐血间充质干细胞及脐带间充质干细胞产量是 2-D 体系的 4~6 倍, 并且流式细胞仪检测显示细胞外基质体系能更好地保持干细胞的表面标记。因此, 3-D 较 2-D 培养系更接近生理环境, 已建立的骨髓源性细胞外基质培养体系能保持间充质干细胞的特性, 为短时间内快速获取更大数目同质、高活性的间充质干细胞提供了可能。

关键词: 脐血间充质干细胞; 脐带间充质干细胞; 细胞外基质; 2-D 培养板; 培养扩增

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.011

邱云, 郑青, 萧树东, 汪铮. 体外模拟干细胞微环境培养扩增脐血及脐带基质源性间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1756-1760. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

由于同时具备多向分化及组织再生能力, 间充质干细胞具有广泛的临床应用前景^[1-4]。脐血及脐带基质来源的间充质干细胞是常见的两种成体干细胞。脐血来源的间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs)较骨髓来源的间充质干细胞具有如下优势: ①来源丰富: 在美国储存有 500 000 份自体脐血标本以及 3 倍于此的异体脐血标本^[5]。②较骨髓或脂肪来源的间充质干

细胞, 具有更大的扩增潜能^[6]。UCB-MSCs 能够产生比骨髓间充质干细胞更多的子代细胞。UCB-MSCs 类似成纤维细胞, 并表达典型的间充质干细胞标志蛋白, 即 CD29, CD44, CD73, CD105, CD106 和 HLA-I 类分子, 但缺乏造血标记。③全能性更强, 更具分化能力。临床前研究证明了在脐血 CD34⁺CD38⁻ 细胞的比率较骨髓更高, 这表明新生儿血液中含有丰富的更原始的祖细胞^[7]。UCB-MSCs 具有胚胎干细胞的特点, 在体内能形成 3 胚层组织。因此, 作为临床应用, 无限来源的 UCB-MSCs 有望代替胚胎干细胞。

但同时其在临床应用时面临着如下挑战:

①脐血中间充质干细胞的数量非常低, 1×10^9 个单核细胞含有4个间充质干细胞。②在体外扩增困难。以前曾试图从脐血中分离间充质干细胞失败^[8-10], 表明在足月分娩脐血间充质祖细胞含量低^[11-12]。UCB-MSCs回收率太低曾被视为并不是实验和临床使用一个可靠的来源。因此有必要寻求一种更高效的富集UCB-MSCs体系。

脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 是临床相对应用成熟的成体干细胞。目前临床实验室使用的UC-MSCs一般都不超过P6, 因体外扩增细胞难以避免出现复制性衰老^[13]。而体内的干细胞在稳定增殖时不会发生这一现象, 国内外研究表明这与干细胞体外扩增时脱离了体内微环境Niche有关, 因此实验假设体外模拟干细胞体内微环境用于扩增UC-MSCs较传统2-D塑料培养体系, 将更好地保存其特性。

1 材料和方法

设计: 细胞学实验, 体外对比观察。

时间及地点: 实验于2010-09/2011-04在上海交通大学医学院附属仁济医院消化疾病研究所完成。

材料: 在产妇知情同意的情况下, 经医院伦理委员会批准, 获取正常供者(足月妊娠的产妇)的脐带及脐血。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
alpha-MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素 PEN、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、0.05%/0.25%胰蛋白酶-EDTA、磷酸盐缓冲液	GIBCO 公司
IV型胶原酶	Sigma 公司
FITC 标记鼠抗人 SSEA-4, CD29, CD31, CD34, CD45, CD44, CD90, CD105, CD146, PE 标记的鼠抗人 CD44	BD 公司
TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG	Santa Cruz 公司
Ficoll-paque PREMIUM	GE Healthcare
荧光倒置显微镜	Olympus 公司
扫描电镜	荷兰飞利浦公司
BD FACSCalibur 流式细胞仪	BD 公司
超净台、CO ₂ 培养箱	HERAEUS

实验方法:

细胞外基质的制备: 实验所用的细胞外基质

板由美国Xiao-Dong Chen教授(University of Texas Health Science Center at San Antonio)惠赠, 其大致的制备方法如下: 新鲜分离的骨髓单个核细胞(MNC)以 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种, 标准培养液(α -MEM+2 mmol glutamine+100 U/mL penicillin+100 g/L streptomycin+体积分数为15%胎牛血清)培养7 d后洗去未贴壁的细胞。用II型胶原酶(400 U/mL)消化贴壁细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种培养15 d, 0.5% Triton X-100去除细胞, 100 U/mL DNase去免疫原性后4 °C储存备用^[14-15]。

UC-MSCs的分离与培养: ①无菌收集脐带, 浸没于含1%青链霉素的PBS中, 玻璃容器密封送回实验室。②超净台上剪取约2 cm长的脐带, 剖开动静脉, 用PBS洗净血污。③将脐带剪碎成肉糜状, 转移到离心管中, 加入4 mL消化液(含0.25%胰酶, 胶原酶II 200~400 U/mL的PBS液), 混匀, 37 °C中消化4 h, 每隔10 min振摇1次。④吸取消化上清, 转移到25 cm²细胞培养瓶中, 加入DMEM/F12培养基(含体积分数为10%~15%胎牛血清), 37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。⑤约3 d能在显微镜下观察到贴壁细胞, 半量换液后继续培养, 3 d后换液, 细胞已经能稳定生长。每3 d换液1次, 至细胞生长铺满瓶底(约10 d), 即可进行传代。

UCB-MSCs的分离与培养: ①样品制备: 在250 mL无菌瓶用无菌1×PBS等体积稀释抗凝人脐血样品, 涡旋约2 min。②在50 mL无菌试管中将10 mL稀释后的CB缓慢叠加到淋巴细胞分离液层(4:1)。③离心, 400 g×30 min, 21 °C。④收集CB-MNCs: 用无菌移液器转移界面层的单个核细胞(MNC, 白色, 长8~10 mL/50 mL)至50 mL无菌离心管。注意不要扰动跨界面层, 以最小的体积尽可能收集界面层所有细胞。吸除多余的Ficoll-paque PREMIUM会导致粒细胞污染, 吸除过多的上清会导致血小板污染。⑤洗涤UCB-MNCs以去除血小板。在每个50 mL试管加入3倍MNC体积的PBS。⑥离心, 420 g (1 600 r/min)×15 min, 21 °C。倒掉上清后用45 mL PBS重悬。⑦离心: 420 g×6 min, 21 °C。重复洗涤1次。⑧弃去上清。重悬在20 mL的 α -MEM/体积分数为2%胎牛血清培养基(1:20稀释)细胞计数。⑨接种: 调整细胞浓度 $1.67 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 将 $1.67 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液种植到6孔板的一个孔中($5 \times 10^6/\text{cm}^2$); CFU-F分析用种植密度为 $1 \times 10^6/\text{well}$, 在体积分数为5% CO₂, 37 °C条件下培养。

Supported by:
Pujiang Talent Plan
Program of Science
Committee of
Shanghai, No.
09PJ1407300*; the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30971468*

Received: 2011-09-10
Accepted: 2011-12-25

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海交通大学 MED-X 仁济干细胞临床研究中心, 上海市 200001

邱云★, 女, 1984年生, 湖南省邵阳市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事干细胞相关研究。

通讯作者: 郑青, 博士, 副教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海市 200001 qingzheng101@qiangzhong.com

通讯作者: 汪铮, 博士, 副教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海交通大学 MED-X 仁济干细胞临床研究中心副主任, 上海市 200001 zheng.w.dr@gmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)10-01756-05

收稿日期: 2011-09-10
修回日期: 2011-12-15
(20110610008/WL-S)

显微镜下观察: 于培养1, 3, 7, 10 d取样, 倒置显微镜下观察细胞生长状况。

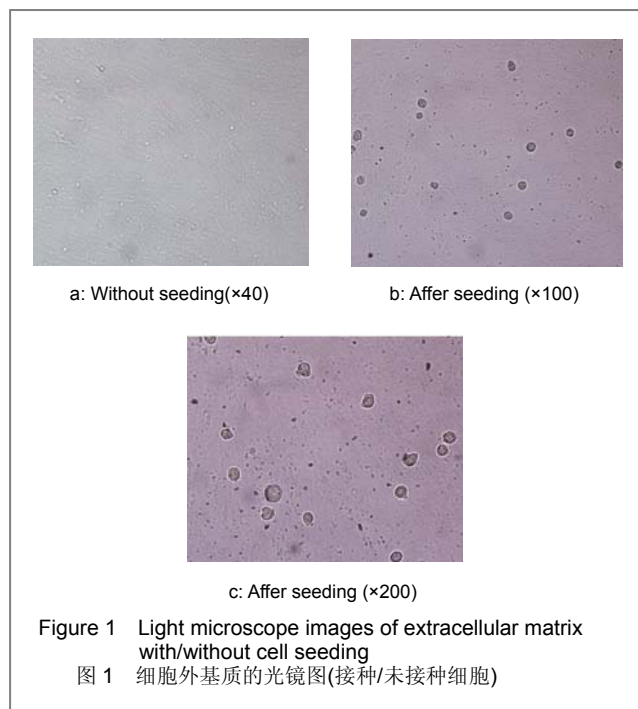
细胞表面标志物的测定: 流式细胞仪检测UCB-MSCs及UC-MSCs经细胞外基质及2-D两种培养体系扩增后各类细胞表面标志物表达率的变化。制成 $2 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 浓度细胞悬液, 与SSEA-4, CD29, CD31, CD34, CD45, CD44, CD90, CD105, CD146单克隆抗体室温反应30 min, PBS洗涤2次后与FITC标记的二抗避光孵育15 min后洗涤2次, 重悬于PBS中, 用于流式细胞仪分析。用小鼠IgG作为阴性对照。

主要观察指标: 两种扩增体系对UCB-MSCs及UC-MSCs体外扩增的优劣。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理。

2 结果

2.1 细胞外基质的形态变化 见图1。



2.2 细胞外基质体系扩增UCB-MSCs 结果显示: 细胞外基质能增强UCB-MSCs的黏附, 见图2, 较现有报道高 4×10^4 倍; 且细胞外基质从脐血中获取大量的克隆形成细胞, 约 $25/10^5$ 单个核细胞; UCB-MSCs经细胞外基质培养后未贴壁细胞经PBS洗脱后FACS测定表面标志物表达的变化显示CD31, CD45持续高表达, 说明未贴壁细胞为造血/内皮祖细胞来源, 通过细胞外基质贴壁法可以有效去除混杂细胞, 而间充质干细胞经典细胞表面标记物CD29, CD105, SSEA-4表达下降, 见图3, 间接说明通过细胞外基质可以从脐血富集

UCB-MSCs。

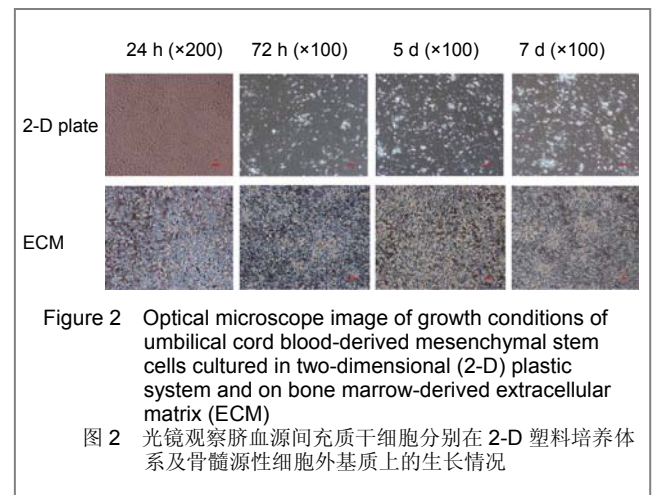


Figure 2 Optical microscope image of growth conditions of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultured in two-dimensional (2-D) plastic system and on bone marrow-derived extracellular matrix (ECM)

图2 光镜观察脐血源间充质干细胞分别在2-D塑料培养体系及骨髓源性细胞外基质上的生长情况

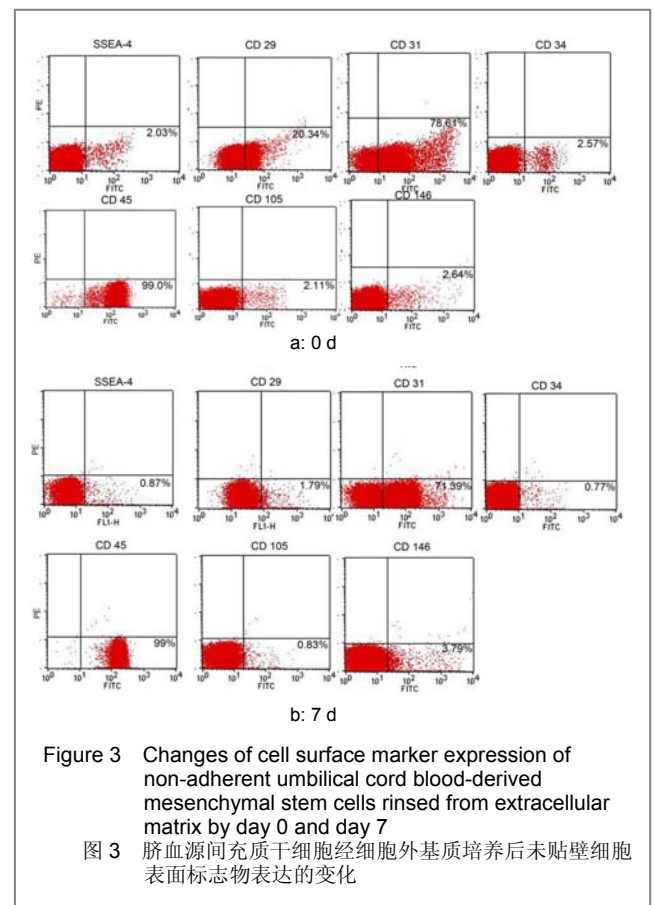


Figure 3 Changes of cell surface marker expression of non-adherent umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells rinsed from extracellular matrix by day 0 and day 7

图3 脐血源间充质干细胞经细胞外基质培养后未贴壁细胞表面标志物表达的变化

2.3 细胞外基质体系扩增UC-MSCs 结果显示: 细胞外基质能高度扩增UC-MSCs, 其效率是传统2-D塑料培养板的4~6倍, 见图4; UC-MSCs经细胞外基质培养后FACS测定表面标志物SSEA-4的表达持续高于平行对照的2-D塑料培养板, 见图5, 且能维持间充质干细胞其他标志物如CD29, CD90, CD44, CD105的持续高表达(>85%), 见图6, 说明经细胞外基质扩增后的细胞较传统2-D塑料培养板能更好地保存间充质干细胞的干细胞特性。

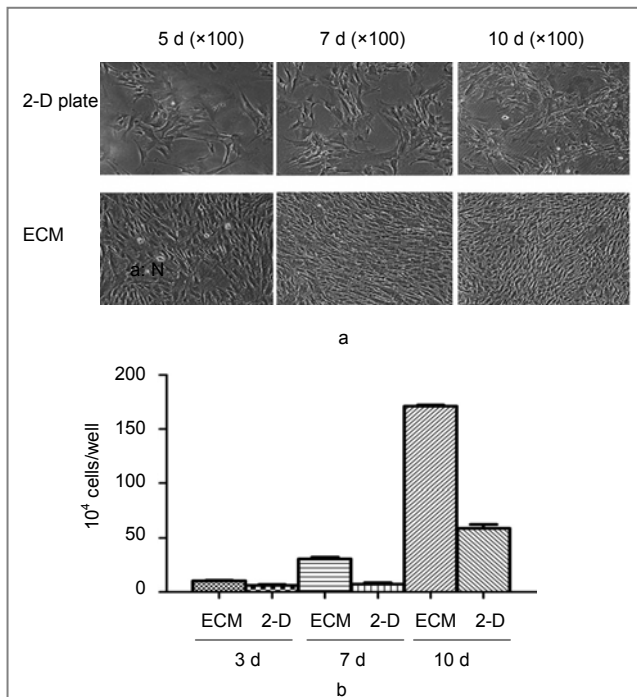


Figure 4 (a) Optical microscope image of growth conditions of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) cultured in two-dimensional (2-D) plastic system and on bone marrow-derived extracellular matrix (ECM). (b) Comparison of the numbers of UC-MSCs cultured and amplified in two-dimensional plastic system and bone marrow-derived ECM

图4 (a)光镜下脐带间充质干细胞分别在2-D塑料培养体系及骨髓源性细胞外基质上的生长状况及(b)扩增倍数的比较

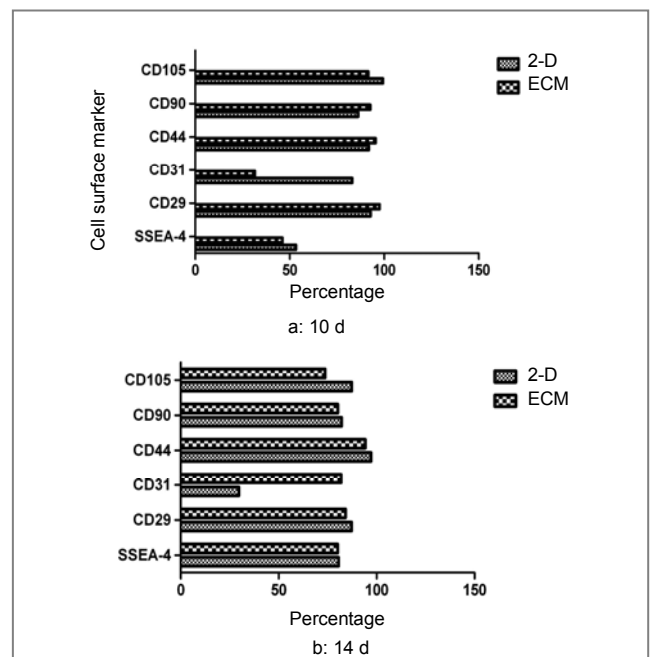


Figure 6 Changes of typical mesenchymal stem cell surface marker expression of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultured and amplified in two-dimensional (2-D) plastic system and bone marrow-derived extracellular matrix (ECM)

图6 脐带间充质干细胞经细胞外基质及2-D两种培养体系扩增后细胞表面标志物的表达变化

3 讨论

目前对细胞治疗的间充质干细胞最大或最小剂量尚无定论, 现行骨髓源间充质干细胞治疗剂量范围为 $(1\sim5)\times 10^6/\text{kg}$ ^[16]。未来的治疗可能需要高纯度的间充质干细胞以明确治疗剂量 $(>5\times 10^6/\text{kg})$ ^[17]。因此需要建立稳健的扩增体系, 从有限的初始细胞数, 经扩增后能够达到 $(5\sim10)\times 10^8$ 间充质干细胞以满足临床需求。如何在体外扩增时最大限度地获得治疗剂量的干细胞数, 同时保存干细胞的特性是临床实验室亟待解决的问题。

干细胞都有其特异的生长微环境, 细胞外基质是微环境的重要组成部分, 为维持细胞功能提供了关键的生化和物理信号, 因此细胞外基质对细胞微环境的体外再造对有效保持干细胞的特性可能是必需的^[15], 这一点常被2-D培养体系所忽略。

Chen等^[15]采用体外的骨髓细胞, 再造了一种天然无细胞的细胞外基质以模拟骨髓微环境(体内间充质干细胞所在的场所)。这种骨髓源性的细胞外基质厚20~100 μm , 包含了I/III型胶原, 纤连蛋白, SLRPs和基底膜的主要组分。与2-D培养体系相比, 在这种细胞外基质培养的间充质干细胞显示出巨大的增殖能力并能维持干细胞群处于较低水平的活性氧中^[18]。前期研究已表明造血干细胞中高水平的活性氧与干细胞特性丢失、分化程度增高及凋亡相关^[19]。因此, 细胞外基质通过抑制

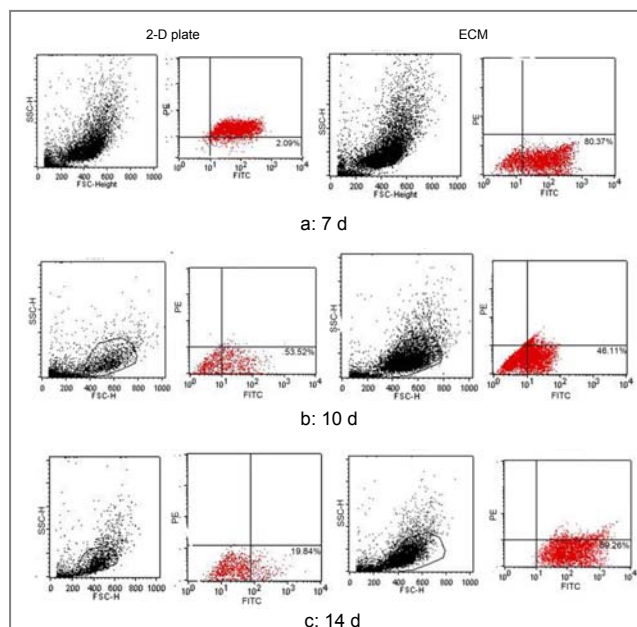


Figure 5 Changes of cell surface marker SSEA-4 expression of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) cultured and amplified in two-dimensional (2-D) plastic system and bone marrow-derived extracellular matrix (ECM)

图5 脐带间充质干细胞经细胞外基质及2-D两种培养体系扩增后细胞表面标志物SSEA-4的表达变化

活性氧对保持间充质干细胞特性有利。基因表达谱分析进一步证实用细胞外基质培养时,骨髓源间充质干细胞中转录因子c-myc, Klf-4, Sox-2(参与干细胞特性的保持)较2-D培养系上调^[20],因此细胞外基质培养能保持细胞未分化状态。如果用细胞克隆形成和体内成骨的潜能对特性加以衡量,多项研究表明在体外培养扩增时间充质干细胞特性会丢失。然而如果用细胞外基质保持细胞,干细胞特性丢失会延缓。与2-D培养系相比,经过多次传代,用细胞外基质培养的人间充质干细胞仍能保持高度的复制能力和高度的端粒酶活性^[20]。端粒酶的激活阻止了端粒受损和干细胞体外培养时复制性衰老^[13]。细胞外基质可能维持高水平的端粒酶活性,导致细胞寿命的延长。

基于UC-MSCs扩增的实验数据显示:使用骨髓源性的细胞外基质培养体系单位时间UC-MSCs的产量是2-D体系的4~6倍,并且FACS检测显示细胞外基质体系能更好地保持干细胞的表面标记。因此,3-D较2-D培养系更接近生理环境,已建立的骨髓源性细胞外基质培养体系能保持间充质干细胞的特性,为短时间内快速获取更大数目同质、高活性的间充质干细胞提供了可能。

UCB-MSCs是一种优质的种子细胞。如果提高从脐血中分离UCB-MSCs的效率,是临床前研究亟待解决的问题。先前的研究显示使用FCS的涂层培养板能去除髓样细胞和骨-碎屑样细胞。已知FCS是干细胞增长的关键,FCS的涂层可能提供额外的生长和黏附因子,有利于间充质干细胞样细胞从脐血产生^[21]。Bieback等^[21]从脐血分离间充质干细胞的频率为 (0.7 ± 0.2) 克隆/ 10^8 ,足月脐血分离成功率为 $0 \sim 2.3/10^8$ 。在生成有间充质干细胞样细胞的脐血单位中,分离的频率 $0.2 \sim 2.3$ 个克隆/ 1×10^8 ,平均 1.1 ± 0.2 不等。为实现这一产量的关键参数包括贮存时间不到15 h,净体积超过33 mL,间充质干细胞数大于 1×10^8 ,没有溶血或凝固迹象。实验结果显示细胞外基质能增强UCB-MSCs的黏附,较现有报道高 4×10^4 倍;UCB-MSCs经细胞外基质贴壁法可以有效去除混杂细胞,从脐血有效富集UCB-MSCs。且经细胞外基质获取的UCB-MSCs具有克隆形成能力,同时高表达Oct-4、Tra-1-60(未发表数据),说明扩增后的细胞具有高度的全能性。说明骨髓源性的细胞外基质培养体系能有效富集高纯度的UCB-MSCs,使得UCB-MSCs用于临床治疗成为可能。

后续实验进一步将扩增后细胞移植至动物疾病模型体内,从功能水平评价细胞外基质培养体系富集及扩增后间充质干细胞治疗的安全性及有效性。

4 参考文献

- [1] Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. BMC Med. 2009;7:29.
- [2] Kung JW, Forbes SJ. Stem cells and liver repair. Curr Opin Biotechnol. 2009;20(5):568-574.

- [3] Copeland N, Harris D, Gaballa MA. Human umbilical cord blood stem cells, myocardial infarction and stroke. Clin Med. 2009;9(4):342-345.
- [4] Ali H, Bahbahani H. Umbilical cord blood stem cells - potential therapeutic tool for neural injuries and disorders. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2010;70(3):316-324.
- [5] Brand A, Rebutta P, Engelfriet CP, et al. Cord blood banking. Vox Sang. 2008;95(4):335-348.
- [6] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006;24(5):1294-1301.
- [7] Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(10):3828-3832.
- [8] Gutiérrez-Rodríguez M, Reyes-Maldonado E, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. Stem Cells. 2000;18(1):46-52.
- [9] Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. Haematologica. 2001;86(10):1099-1100.
- [10] Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br J Haematol. 2003;121(2):368-374.
- [11] Erices A, Conget P, Minguez JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000;109(1):235-242.
- [12] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. Biol Blood Marrow Transplant. 2001;7(11):581-588.
- [13] Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. Cell Res. 2008;18(7):725-732.
- [14] Vlodavsky I. Preparation of extracellular matrices produced by cultured corneal endothelial and PF-HR9 endodermal cells. // Morgan K (ed.), Current Protocols in Cell Biology, 1999 vol UNIT 10.4. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp. 10.4.1-10.4.14.
- [15] Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, et al. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. J Bone Miner Res. 2007;22(12):1943-1956.
- [16] Subbanna PK. Mesenchymal stem cells for treating GVHD: in-vivo fate and optimal dose. Med Hypotheses. 2007;69(2):469-470.
- [17] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(5):389-398.
- [18] Lai Y, Sun Y, Skinner CM, et al. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2010;19(7):1095-1107.
- [19] Tothova Z, Kolipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell. 2007;128(2):325-339.
- [20] Chen XD. Extracellular matrix provides an optimal niche for the maintenance and propagation of mesenchymal stem cells. Birth Defects Res C Embryo Today. 2010;90(1):45-54.
- [21] Bieback K, Kern S, Klüter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22(4):625-634.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 上海市科委浦江人才计划项目(09PJ1407300); 国家自然科学基金项目(30971468)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计及实验实施, 实验评估为通讯作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第三作者审核, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 产妇对实验知情同意, 实验方案经医院伦理委员会批准。

关键信息: ①使用骨髓源性的细胞外基质培养体系单位时间脐带间充质干细胞的产量是2-D体系的4~6倍, 并且流式细胞仪检测显示细胞外基质体系能更好地保持干细胞表面标记。因此, 3-D较2-D培养系更接近生理环境。②骨髓源性细胞外基质培养体系能有效富集脐血间充质干细胞。