doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.026 [http://www.crter.org]
李炳尧，武晓云，吴岩. 间充质干细胞的分离与培养：从实验室到临床[J].中国组织工程研究，2013，17(14):2649-2655.

间充质干细胞的分离与培养：从实验室到临床**★**

李炳尧[1]，武晓云[2]，吴 岩[1]

1 内蒙古医科大学，内蒙古自治区呼和浩特市 010059
2 北京京蒙高科干细胞技术有限公司，北京市 100085

文章亮点：

1 此问题的已知信息：间充质干细胞的基础生物学特性、基础分离方法及基础培养手段的应用。

2 文章增加的新信息：间充质干细胞在体外培养和体外扩增及生产体系的归纳与补充。

3 临床应用的意义：间充质干细胞在运用于临床之前，需要大量的体外扩增满足临床需求。探讨间充质干细胞相关体外培养技术，为间充质干细胞培养体系的建立提供更多的思路。

关键词：

干细胞；干细胞学术探讨；间充质干细胞；来源；分离；非分化扩增；无血清；微载体悬浮培养；表型；分化；脐带；省级基金

摘要

背景：间充质干细胞是多能成体干细胞，对间充质干细胞来源、分离、培养的研究无论从观念上、研究方法上还是研究结果均不尽相同。

目的：综述间充质干细胞分离、培养研究的新进展。

方法：由作者应用计算机检索2007至2011年PubMed 数据库，在英文标题和摘要中以“mesenchymal stem cells”和“source, isolation or culture”检索，选择内容与间充质干细胞应用相关的文章，同一领域文献则选择近期发表或发表在权威杂志文章，共纳入43篇文献。

结果与结论：间充质干细胞的规范化培养需要建立一套标准化的培养体系来实现间充质干细胞的分离、大量增殖。因此，需要进一步深入开展间充质干细胞的基础研究，建立体外扩增和向不同细胞定向诱导分化体系，开展间充质干细胞及转基因后移植的体内效应研究等均具有重要的意义。

李炳尧★，男，1982年生，内蒙古自治区赤峰市人，汉族，内蒙古医科大学在读硕士，医师，主要从事间充质干细胞培养、临床应用研究。
cell2112@sina.com

通讯作者：吴岩，博士，教授，硕士生导师，内蒙古医科大学，内蒙古自治区呼和浩特市 010059
yanw007@sina.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344 (2013)14-02649-07

收稿日期：2012-06-08
修回日期：2012-08-27
(20120608008/M · S)

Isolation and culture of mesenchymal stem cells: From laboratory research to clinical application

Li Bing-yao[1], Wu Xiao-yun[2], Wu Yan[1]

1 Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China
2 Beijing Jingmeng Stem Cell High-Tech Co., Ltd., Beijing 100085, China

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells are multipotent adult stem cells. The source, isolation and culture of mesenchymal stem cells differ greatly in different studies in terms of concepts, research methods and outcomes.

OBJECTIVE: To investigate the progress in isolation and culture of mesenchymal stem cells.

METHODS: The PubMed database (http://www.ncbi.nim.nih.gov/PubMed) was retrieved for articles regarding application of stem cells from 2007 to 2011 by computer. The English key words are “mesenchymal stem cells” and “source isolation or culture”. The papers published recently or in authoritative journals were selected. Forty-three papers were suitable for final analysis.

Li Bing-yao★, Studying for master's degree, Physician, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China
cell2112@sina.com

Corresponding author: Wu Yan, M.D., Professor, Master's supervisor, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China
yanw007@sina.com

Supported by: Stem Cell Innovation Team Program of Science and Technology Bureau of Inner Mongolia Autonomous Region of China, No. KJT2009*

Received: 2012-06-08
Accepted: 2012-08-27

RESULTS AND CONCLUSION: A standardized culture system should be established to achieve isolation and expansion *in vitro* of mesenchymal stem cells. Therefore, basic research of mesenchymal stem cells should be further developed, and the system of *in vitro* expansion and oriented differentiation of mesenchymal stem cells should be established, and study on the effects of transplantation of gene-transfected mesenchymal stem cells is of great significance.

Key Words: stem cells; stem cell academic discussion; mesenchymal stem cells; source; isolation; non-differentiation expansion; serum-free; microcarrier suspending culture; phenotype; differentiation; umbilical cord; provincial grants-supported paper

Li BY, Wu XY, Wu Y. Isolation and culture of mesenchymal stem cells: From laboratory research to clinical application. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(14):2649-2655.

0 引言

间充质干细胞是属于中胚层的一类多能干细胞，具有强大的增殖能力和多向分化潜能，在适宜的体内或体外环境下不仅可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞，还具有分化为肌细胞、肝细胞、造血细胞、神经细胞、胰岛细胞等多种细胞的能力。间充质干细胞来源广泛，易于分离、培养、扩增和纯化，免疫原性低，不存在伦理问题的争议，所以在组织工程、基因治疗和免疫治疗方面有着巨大的应用前景。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者应用计算机检索Pubmed数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)相关文献。检索时间范围：1999年1月至2009年10月。检索词为“mesenchymal stem cells, source, isolation, culture”。共检索到文献179篇。

1.2 入选标准

纳入标准：①具有原创性，论点论据可靠的文章。②针对性强，相关度高的文献。③对同一领域的文献选择近期发表或权威杂志的文献。

排除标准：较陈旧的理论观点以及一些重复性研究。

1.3 质量评估 初检得到179篇文献，其中英文文献103篇，中文文献76篇。阅读标题和摘要进行初筛，排除与研究目的不符和重复性文章；查阅全文，判断与纳入标准一致的文章，最后选择43篇符合标准的文献。

2 结果

2.1 间充质干细胞的来源和生物学特性 间充质干细胞最早在骨髓中发现，因培养后细胞表型为成纤维细胞样，而被称为成纤维细胞集落形成单位。由于对骨髓血系细胞起支持诱导作用，可促进造血细胞克隆的形成，因而推测这种细胞可能是间质细胞的前体细胞，又因其来自于骨髓基质，将其称为“骨髓基质细胞”。早期实验研究用得最多的是骨髓来源的骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞占骨髓有核细胞的0.01%-0.000 1%。目前，越来越多的研究表明还能够从脂肪、滑膜、骨骼、肌肉、肺、肝、胰腺、羊水以及脐血等组织中分离和制备间充质干细胞[1]。但实验室和临床上用得最多的仍然还是骨髓来源的间充质干细胞。骨髓来源的间充质干细胞存在以下问题：随着年龄的老化，干细

胞数目显著降低，增殖分化能力大幅度衰退；制备过程不容易质控；移植给异体可能引起免疫反应；取材时对患者有损伤，患者有骨髓疾病时不能采集。即使是健康供者，亦不能抽取太多的骨髓。这都限制了骨髓间充质干细胞临床应用，使得寻找骨髓以外其他可替代的间充质干细胞来源成为一个重要的问题。临床上作为脐血来源的间充质干细胞培养成功率很低，一般只有20%-30%的脐血样本培养后能分离出间充质干细胞。为了有效地提高脐血间充质干细胞原代培养成功率，应用正交实验设计法在间充质干细胞传统培养方法的基础上，通过添加细胞因子白细胞介素3和粒细胞-集落刺激因子的方法可以使脐血间充质干细胞的原代培养成功率由传统方法的25%左右提高到90%以上[2]。

脐带是孕妇与胎儿之间的物质交通支，也是分娩后的废弃物，收集脐带对产妇和胎儿均不造成伤害，取材也不受伦理学的困扰。另外从胚胎发育而言，脐带的免疫原性低，可以降低或避免免疫排斥。一些研究者比较了脐带间充质干细胞和骨髓间充质干细胞，发现前者比后者有更快的增殖能力和更好的成骨分化能力，因此脐带是临床上间充质干细胞的主要来源。也有一些研究者认为脂肪组织是间充质干细胞最理想的来源[3]，因为其来源的间充质干细胞具有和骨髓源间充质干细胞相似的表型、增殖能力和分化能力，而且脂肪非常丰富且取材简单，捐献者可以避免痛苦[3]。

目前，国际干细胞治疗学会提出了鉴定人来源间充质干细胞的3条最低标准[4]：①在标准培养条件下，间充质干细胞具备对塑料底物的贴附性。②间充质干细胞群体表达CD105、CD73及CD90，而不表达造血标志物CD45和CD34。③经体外诱导，间充质干细胞能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。这仅仅是间充质干细胞的体外鉴定，一些研究者一直寻求间充质干细胞的体内鉴定[5]。随着对间充质干细胞的深入研究，发现间充质干细胞可以分化成血细胞和肌细胞，还具有跨胚层分化的可塑性。间充质干细胞具有向外胚层神经细胞分化和内胚层肝细胞、胰岛细胞分化的能力[6]。而且间充质干细胞具有非常低得免疫原性。间充质干细胞分泌多种细胞因子发挥造血支持和免疫调节等功能[7-8]。间充质干细胞的这些生物学特性，显著推动了间充质干细胞的应用范围和应用价值。

间充质干细胞的标准定义：

间充质干细胞的生物学特性

(1)贴壁黏附生长，成纤维状。
(2)能够形成纤维细胞集落单位。
(3)$CD73^+$，$CD90^+$，$CD105^+$，$HLA\text{-}DR^-$， $CD11b^-$，$CD14^-$，$CD19^-$，$CD34^-$，$CD45^-$。
(4)多向分化(成骨、成脂肪、成软骨、成肌、造血分化)。
(5)可塑性(神经分化、胰岛分化、肝脏分化)。
(6)免疫调节功能。
(7)非常低的免疫原性[9-10]。
(8)分泌多种细胞因子[7]，参与造血支持、免疫调节、防瘢痕化、细胞迁移等作用。

2.2 间充质干细胞的分离 间充质干细胞在组织中的比例极低，因此，如何获取高纯度的间充质干细胞相当重要。目前最常用的分离间充质干细胞的方法有组织消化法、全骨髓贴壁法和密度梯度离心法。不同组织来源的间充质干细胞分离方法不同。脐带、羊膜、脂肪等组织一般先采用各种酶(胶原酶和胰酶等)消化、分离组织中的有核细胞、然后通过贴壁法进一步分离纯化间充质干细胞。一些实验研究者通过组织块培养法收获的原代细胞产量比对应的酶消化法要多且成功率高，降低了培养的成本和难度，避免了培养中异种蛋白的混入而降低临床排斥反应[11]。本实验室进行组织消化法和组织直接培养法比较，发现组织直接培养法在较短的时间内就会出现成纤维集落，缩短了原代细胞培养的时间。骨髓、外周血和脐血等主要采用先用Percoll或Ficoll离心方法分离单个核细胞，然后用贴壁法进一步分离纯化间充质干细胞。改进密度梯度离心法，可提高了骨髓源间充质干细胞的分离效率和富集[12]。采用直接全骨髓贴壁法分离间充质干细胞，但这种方法需要比较高的接种密度。间充质干细胞的分离除了这些方法外，也有使用流式细胞仪和免疫磁珠分选法进行分离。但因为缺乏对间充质干细胞特异性表面表型的认识，再加上这两种方法需要比较精密的仪器，所以一般的实验室和临床应用很少采用这两种方法。

2.3 间充质干细胞的非分化型扩增培养 通过体外分离获取的间充质干细胞数量非常有限，远远无法满足临床和研究的需求。非分化性增殖，即在保持间充质干细胞的多向分化潜能和未分化状态的同时又能快速有效地增殖，成了目前急需解决的问题。

目前国内外实验室的间充质干细胞的扩增体系，

多含有经过筛选的牛血清为主要营养支持物。但这种扩增体系，随着细胞的传代，细胞增殖能力会逐渐下降，细胞会出现分化和衰老现象。因此，一些研究者在使用血清的时候还要加入一些生长因子，如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因β[13-14]。或多种细胞生长因子，如血小板源性生长因子、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子1和转化生长因β等单独或联合使用，都能促进间充质干细胞的增殖。在这些生长因子中，碱性成纤维细胞生长因子的作用最突出[15]。碱性成纤维细胞生长因子作为有效的有丝分裂原用于间充质干细胞，保持分化潜能，增加端粒长度。通常人间充质干细胞培养不超过20代，而添加碱性成纤维细胞生长因子后，细胞培养超过50代，仍具有增殖能力。同时，在促进增殖方面，碱性成纤维细胞生长因子也有多重效应。它能增强人类白细胞抗原表达，增加免疫原性，同时促进成骨分化，而抑制其他方向(如神经)分化。如何合理使用这些生长因子，维持稳定增殖，减少分化，正成为当前研究的热点。当前，一些公司和实验室都在开发新一代的化学组分限定培养基，如Invitrogen开发Stem Pro® MSC SFM 和加拿大Stem Cell 公司开发了MesenCult®-ACF Medium等，这些针对间充质干细胞的无血清培养基化学成分明确，此类培养基是目前安全、理想的培养基。首先可以保证培养基批次间的一致性，其次是培养基的性质明确，有助于进一步研究间充质干细胞定向分化的调控，提高实验的准确性。而且也有利于进行细胞培养的代谢研究，同时分离纯化也比较方便。这种培养基的开发极大推动了间充质干细胞分泌因子和信号传导方面的研究。有一些研究者采用自行配制间充质干细胞无血清培养基，它由基础培养基和替代血清的补充因子组成。IMDM或DMEM/F12为基础培养基，主要的补充因子有亚硒酸钠、转铁蛋白、牛血清白蛋白、胰岛素、氢化可的松[16]。针对间充质干细胞的贴壁采用了明胶、层粘连蛋白、胶原蛋白、纤粘连蛋白包被细胞培养瓶[17]。此种无血清培养基成功培养出了人骨髓间充质干细胞。在有血清和无血清培养条件下培养到第4代，所得间充质干细胞形态均质性好。但有血清培养贴壁细胞及细胞集落出现比无血清培养早，分化也更快。干细胞的分裂通常是不对称分裂，形成一个子代干细胞和一个祖细胞，祖细胞只具有有限的自我更新能力，它将不断向下分化形成不同分化程度的成熟细胞。因此有血清培养间充质干细胞虽然增殖快，但细胞中却获得相当数量的祖细胞。而无血清培养能得到更多，更纯的间充质干细胞，并更好地保持其干细胞特性[18]。化学组分限定培养基也有一些缺点：①需要在高密度下接种，一般接种密度不低于3 000/cm^2。②需要包被细胞培养瓶来解决间充质干细胞的贴壁问题。③价格昂贵。④间充质干细胞在无血清培养过程中更易受某些机械因素和化学因素的影响。⑤无血清培养基保存难度较大。这些因素极大地限制这种培养基向临床的转化。

间充质干细胞在运用于临床之前，需要大量体外扩增满足临床需求。目前临床上间充质干细胞的体外培养扩增体系主要是基础培养基添加一定浓度的胎牛血清。尽管欧洲等国允许使用胎牛血清，但中国和美国等国家严禁在细胞治疗中使用动物源成分。胎牛血清中含有异种蛋白质，它本身有携带细菌、病毒、蛋白传染性疾病或朊病毒的风险。另外，有研究表明间充质干细胞在培养过程中可以吞噬培养基中的蛋白，内含有牛血清蛋白(7−30 mg/10^8 cells)，可以使受者体内产生抗牛蛋白抗体引起免疫反应，从而导致患者重复输注干细胞治疗后失效。因此胎牛血清在干细胞临床大规模培养中的不利因素已经逐渐暴露出来，现已有很多学者研究胎牛血清的替代品。一些临床研究使用商用血清替代物Ultroser G(Pall BioSepra)，这种培养基含有多种生长因子、结合蛋白、维生素和激素，能较好地满足间充质干细胞生长的需要，然而Ultroser G仍然还有一些动物源成分。目前人们使用较多的是应用人血清或血清衍生物来替代[19]。包括成人血清[20-21]、血小板衍生物(血小板裂解液[22]、凝血酶激活血小板释放因子)、脐血清等[23-24]。人自体血清已被证明在间充质干细胞的非分化性扩增方面有相当的优势[16, 20, 25]。与胎牛血清相比较，人自体血清能促进间充质干细胞更快地增殖，获得了较高的克隆形成率(CFU-F)，并且在培养过程中能维持细胞转录水平的稳定，减少细胞自发分化，抑制多次传代后的细胞衰老。利用人自体血清培养的间充质干细胞已经被证明保持了成骨，软骨和脂肪分化的潜能[19]。一些研究者也探索了异体脐带血清对间充质干细胞的支持扩增作用，结果显示间充质干细胞在异体血清中比胎牛血清有更强的自我更新能力、更短的倍增时间和更好成骨分化能力[26-28]。因此，脐带血清也可以作为替代胎牛血清的间充质干细胞扩增添加物。血小板来源于人类，输注人体内不会引

起异种蛋白的免疫，且能够释放多种生长因子，在组织修复以及细胞生长等方面起着重要的作用。由于人血小板提取物中含有丰富的生长因子，如碱性成纤维细胞生长因子，转化生长因子β，胰岛素样生长因子1等，因此可以替代胎牛血清用于间充质干细胞培养[22,29]。与胎牛血清比较，含血小板提取物的培养基能使细胞增殖更快，集落形成更大，达到汇合时间更短[30]。而且已经证明用血小板裂解物培养的间充质干细胞有更好的向成骨，软骨和脂肪分化的潜能，同时保持了免疫调节的能力[13，31]。

目前，在实验室和一些临床GMP生产体系中，间充质干细胞的体外扩增主要采用小规模的静态培养方式。但是，随着间充质干细胞体外培养技术的发展及临床需求的要求，小规模的静态培养显然不能满足需要。同时，静态培养有其固有的局限性：培养环境不均一，培养参数不能实时监测和调控，以及不利于大规模的培养等。因此，安全有效地大规模培养间充质干细胞已经被提上日程。一些研究者利用微载体悬浮培养体系[32]，在搅拌式生物反应器内扩增间充质干细胞，通过检测间充质干细胞体外扩增速率、表面标记物、细胞代谢及培养液的pH值变化，探讨微载体悬浮培养搅拌式生物反应器可以用作体外大量扩增间充质干细胞的方法[33]。搅拌式生物反应器通过叶轮或桨式搅拌器的转动来搅动培养液，以增加传质能力，确保细胞培养的氧浓度和培养液养分的均匀，有利于细胞保持天然形态，并维持其新陈代谢在正常的生理范围内，由于微载体具有极大的比表面积，间充质干细胞可以贴壁到微载体上，很小的空间可以培养出大量的细胞。生物反应器技术能够为间充质干细胞提供相对均一的营养环境，而且增加了细胞之间三维联系的机会，使细胞更接近于自然生长状态，较传统的培养瓶/培养皿更利于细胞的增殖。同时，一些研究者也实验表明，在低氧情况下(体积分数为2% O_2)，体外扩增间充质干细胞具有更快的增殖速度和新陈代谢能力[34]。

3 间充质干细胞的安全性

尽管间充质干细胞已用于多种疾患的治疗，然而这类细胞被发现具有多项负面效应，尤其是间充质干细胞的致瘤性，早起人们认为间充质干细胞不存在瘤变的可能，但是最近的报道发现间充质干细胞在体外扩增、冻存、复苏、运输的过程中有癌变的可能。间充质干细胞本身的恶变通常发生在以下几种情况：间充质干细胞在体外扩增阶段；间充质干细胞在冻存和复苏阶段；间充质干细胞在运输的过程中；间充质干细胞与肿瘤间质相互作用阶段；间充质干细胞基因操作导致此类细胞恶变。临床上为了获得足够的间充质干细胞，必须在体外进行大量扩增，这种多次传代易导致间充质干细胞发生恶变。2005年和2010年有报道间充质干细胞在体外经长期扩增可产生不死性，并自发性恶变。在其随后的研究中表明，此类细胞通过上调c-myc的表达、抑制P16水平、获得端粒酶活性、InK4a/Arf位点缺失、Rb磷酸化使其获得长期生存特性。此外，线粒体代谢调控、DNA损伤修复蛋白和细胞周期调控因子在细胞恶变中起到一定作用[35-36]。

关于间充质干细胞对肿瘤的调节作用一直存在争议。有研究认为，间充质干细胞可抑制肿瘤的生长，而有研究显示，间充质干细胞具有肿瘤保护作用，可抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤增长及迁移，增强癌细胞的药物抵抗。尽管众多试验表明，间充质干细胞可抑制癌细胞的增殖，然而其往往伴随着抗凋亡效应。Ramasamy等[37]报道间充质干细胞可抑制造血细胞和非造血细胞源性恶性肿瘤的增殖与凋亡，并使肿瘤细胞停止在G_1期，当肿瘤细胞与间充质干细胞一起注入到体内，肿瘤的生长速度明显快于单独注入的肿瘤细胞。Tian等[38]研究显示，人间充质干细胞对肿瘤细胞的生长在体内与体外具有双重作用，在体外人间充质干细胞抑制A549(肺癌)和Eca-109(食管癌)增殖，使肿瘤细胞处于G_1期，促进其凋亡。在体内人间充质干细胞能够促进肿瘤形成和生长。

间充质干细胞除具有抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤生长外，还与肿瘤细胞的转移密切相关。最近研究显示，间充质干细胞能够定向趋化于肿瘤原发灶和转移灶，在局部分泌炎症趋化因子，可促进肿瘤细胞发生肺转移，且与乳腺癌的发生具有显著相关[39]。此外，间充质干细胞可促进肿瘤细胞对化疗药物产生药物抵抗。Kurtova等[40]实验表明，间充质干细胞可抑制氟达拉滨、地塞米松及环磷酰胺诱导的慢性淋巴细胞性白血病细胞的凋亡。Vianello等[41]研究显示，骨髓来源的间充质干细胞可抑制伊马替尼诱导的慢性粒细胞白血病细胞的凋亡，其干预机制是通过CXCR4/

CXCL12轴进行的，如能够中断此条途径，即可恢复白血病细胞对伊马替尼的敏感性。

间充质干细胞具有归巢到肿瘤细胞的特性，这种归巢作用不仅可促进肿瘤生长，而且可使间充质干细胞在肿瘤部位发生恶变。将间充质干细胞置于肿瘤生长环境中，这些细胞能够分化为癌症相关成纤维细胞或肿瘤相关成纤维细胞，有利于肿瘤纤维血管网的扩张和肿瘤增长[42]。

为了提高间充质干细胞的临床疗效，目前多采用病毒或非病毒载体对其进行基因转染。然而这些基因操作存在着众多风险和不利，如转基因可能为致瘤基因、转基因位点的插入使间充质干细胞基因组发生断裂等，均可导致间充质干细胞发生恶变。Takeuchi等[43]研究显示，转基因间充质干细胞体外培养可导致线粒体不稳定，具有自发癌病的危险。

4 小结

间充质干细胞具有广阔的应用前景，但目前国内外关于间充质干细胞来源、分离、体外非分化性增殖没有统一的标准体系。因此，建立一套标准化的培养体系来实现间充质干细胞的分离、大量增殖，从而建立间充质干细胞细胞系就显得十分必要。当前，间充质干细胞还有许多问题有待解决。如间充质干细胞的起源，间充质干细胞的定向分化机制，间充质干细胞特定功能状态的调控机制，体外操作对其生物学特征的影响等。故而进一步深入开展间充质干细胞的基础研究，建立体外扩增和向不同细胞定向诱导分化体系，开展间充质干细胞及转基因后移植的体内效应研究等均具有重要的意义。另外，如何充分发挥中医药多途径、多靶点、毒副作用小等优势，通过实验研究筛选有效的中药及其有效成分，提高间充质干细胞的扩增、分化效率，也值得进一步研究。

基金资助：内蒙古科技厅干细胞创新团队项目(KJT2009)。

作者贡献：第一作者构思并设计本综述，第一作者解析相关数据，第一作者对本文负责。第二作者审校。

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：无涉及伦理冲突的内容。

作者声明：文章为原创作品，数据准确，内容不涉及泄密，无一稿两投，无抄袭，无内容剽窃，无作者署名争议，无与他人课题以及专利技术的争执，内容真实，文责自负。

5 参考文献

[1] Camassola M, de Macedo Braga LM, Chagastelles PC,et al. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol. 2012;879: 491-504.
[2] Fan X, Liu T, Liu Y,et al. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. Biotechnol Prog. 2009;25(2): 499-507.
[3] Boquest AC, Collas P. Obtaining freshly isolated and cultured mesenchymal stem cells from human adipose tissue. Methods Mol Biol. 2012;879:269-278.
[4] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317.
[5] da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008; 26(9):2287-2299.
[6] Ngoc PK, Phuc PV, Nhung TH,et al. Improving the efficacy of type 1 diabetes therapy by transplantation of immunoisolated insulin-producing cells. Hum Cell. 2011;24(2):86-95.
[7] Hwang JH, Lee MJ, Seok OS,et al. Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies.Cytokine. 2010;49(1): 95-101.
[8] Sumanasinghe RD, Pfeiler TW, Monteiro-Riviere NA,et al. Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain. J Cell Physiol. 2009;219(1):77-83.
[9] Huang XP, Sun Z, Miyagi Y,et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. Circulation. 2010;122(23):2419-2429.
[10] Schu S, Nosov M, O'Flynn L,et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. J Cell Mol Med. 2012; 16(9):2094-2103.
[11] Liu L, Zhao X, Li P,et al. A novel way to isolate MSCs from umbilical cords. Eur J Immunol. 2012;42(8):2190-2193.
[12] Pierini M, Dozza B, Lucarelli E,et al. Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. Cytotherapy. 2012;14(6):686-693.
[13] Chieregato K, Castegnaro S, Madeo D,et al. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. Cytotherapy. 2011;13(8):933-943.
[14] Meyerrose T, Olson S, Pontow S,et al. Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(12):1167-1174.

[15] Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P,et al. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. Stem Cell Res. 2010;5(3):244-254.
[16] Felka T, Schäfer R, De Zwart P,et al. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2010;12(2):143-153.
[17] Jung S, Sen A, Rosenberg L,et al. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2010; 12(5):637-657.
[18] Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L,et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. Stem Cells Int. 2012;2012:123030.
[19] Hatlapatka T, Moretti P, Lavrentieva A,et al. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions.Tissue Eng Part C Methods. 2011;17(4): 485-493.
[20] Poloni A, Maurizi G, Serrani F,et al. Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. Cell Prolif. 2012;45(1):66-75.
[21] Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ,et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. Haematologica. 2011;96(7):1072-1076.
[22] Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z,et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res Ther. 2012;3(1):6.
[23] Tekkatte C, Vidyasekar P, Kapadia NK,et al. Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. Cell Tissue Res. 2012;347(2):383-395.
[24] Phadnis SM, Joglekar MV, Venkateshan V,et al. Human umbilical cord blood serum promotes growth, proliferation, as well as differentiation of human bone marrow-derived progenitor cells.In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2006;42(10): 283-286.
[25] Duggal S, Brinchmann JE. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. J Cell Physiol. 2011;226(11): 2908-2915.
[26] Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2007;31(3):293-298.
[27] Ma HY, Yao L, Yu YQ,et al. An effective and safe supplement for stem cells expansion ex vivo: cord blood serum.Cell Transplant. 2012;21(5):857-869.
[28] Jung J, Moon N, Ahn JY,et al. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential.Stem Cells Dev. 2009;18(4):559-571.
[29] Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S,et al. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biotechnol Lett. 2012;34(7):1367-1374.
[30] Xia W, Li H, Wang Z,et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2011;35(6):639-643.
[31] Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L,et al. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. Eur J Immunol. 2011;41(11):3281-3290.
[32] Eibes G, dos Santos F, Andrade PZ,et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. J Biotechnol. 2010; 146(4):194-197.
[33] dos Santos F, Andrade PZ, Eibes G,et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. Methods Mol Biol. 2011;698:189-198.
[34] Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS,et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. J Cell Physiol. 2010;223(1):27-35.
[35] de la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J,et al. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2010;70(16):6682.
[36] Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC,et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035-3039.
[37] Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I,et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. Leukemia. 2007;21(2):304-310.
[38] Tian LL, Yue W, Zhu F,et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. J Cell Physiol. 2011;226(7):1860-1867.
[39] Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K,et al. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. Mol Cancer. 2010;9:129.
[40] Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R,et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. Blood. 2009;114(20): 4441-4450.
[41] Vianello F, Villanova F, Tisato V,et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. Haematologica. 2010;95(7): 1081-1089.
[42] Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK,et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. PLoS One. 2009;4(4):e4992.
[43] Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A,et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2007;43(3-4):129-138.