

无动物源性成分培养基体外扩增的间充质干细胞

吴迪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: 传统培养基中含有胎牛血清, 可能携带动物细菌、病毒、蛋白传染性疾病或朊病毒, 用其培养的间充质干细胞输入人体后, 具有潜在传播疾病的风险。
- 2 文章增加的新信息: 在间充质干细胞的体外扩增过程中, 为了避免培养基中的动物源性成分, 本文着重讨论了替代胎牛血清的其他添加剂的优缺点以及应用前景。
- 3 临床应用的意义: 间充质干细胞体外大规模扩增培养是实验研究和临床应用的基础, 还需在此基础上构建一个立体全面、有效、安全的扩增间充质干细胞的评价体系, 保证间充质干细胞临床治疗安全化和规范化。

关键词:

干细胞; 间充质干细胞; 人血清; 脐血清; 富血小板血浆; 血小板裂解液; 化学成分明确无血清培养基

主题词:

间充质干细胞; 培养基; 血清; 富血小板血浆

基金资助:

内蒙古自治区科技创新团队资助项目(kjt0020947)

摘要

背景: 间充质干细胞是组织工程、再生医学和免疫抑制治疗领域重要的种子细胞来源, 在体外大量扩增成为其进入临床应用的关键环节。

目的: 对无动物源性成分培养基体外扩增间充质干细胞的研究进展做一综述。

方法: 由第一作者应用计算机检索 2004 年 1 月至 2014 年 4 月中国期刊全文数据库(CNKI)及 PubMed 数据库, 英文检索词为“mesenchymal (stromal) stem cells”, “animal serum-free media”, “humanized media”, “human serum”, “umbilical cord blood serum”, “platelet rich plasma”, “platelet lysate”, “defined medium”, 中文检索词为“间充质干细胞、无动物血清培养基、人源性培养基、人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解液、化学成分明确无血清培养基”, 最终保留 41 篇文献。

结果与结论: 采用人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解液以及化学成分明确无血清培养基等可替代胎牛血清, 在体外进行间充质干细胞的大规模扩增培养, 但是这些培养基添加剂各有其优势和劣势, 所以在大规模、系统地应用于临床治疗前, 急需解决的问题就是扩增后的功能有效性与移植安全性。

吴迪, 武晓云, 吴岩. 无动物源性成分培养基体外扩增的间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28): 4583-4587.

In vitro expansion of human mesenchymal stem cells in animal serum-free media

Wu Di¹, Wu Xiao-yun², Wu Yan¹ (¹Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Beijing Jingmeng Stem Cell High-Tech Co., Ltd., Beijing 100085, China)

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells have been an important source of seed cells for tissue engineering, regenerative medicine and immunosuppressive therapy areas. The large expansion is the key to the clinical application of mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To summarize the research progress in the *in vitro* expansion of human mesenchymal stem cells in animal serum-free media.

METHODS: A computer-based online retrieval of CNKI and PubMed databases was performed to search papers published between 2004 and 2014 using the key words of “mesenchymal (stromal) stem cells, animal serum-free media, humanized media, human serum, umbilical cord blood serum, platelet rich plasma, platelet lysate, defined medium” in English and Chinese, respectively. Finally, 41 articles were retained.

RESULTS AND CONCLUSION: Human serum, umbilical cord blood serum, platelet rich plasma, platelet lysate and defined medium can replace fetal bovine serum for large-scale expansion of mesenchymal stem cells *in vitro*. These media or additives have their advantages and disadvantages; therefore, it is urgent to guarantee the functional effectiveness and transplantation safety before large-scale, systematic clinical application of mesenchymal stem cells.

Subject headings: mesenchymal stem cells; culture media; serum; platelet-rich plasma

Funding: Stem cell Technology Innovation Team Funded Project in Inner Mongolia Autonomous Region, No. kjt0020947

吴迪, 女, 1988 年生, 内蒙古自治区呼伦贝尔市人, 蒙古族, 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。

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

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.026
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04583-05

稿件接受: 2014-06-08

Wu Di, Studying for master's degree, Physician, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

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

Accepted: 2014-06-08

Wu D, Wu XY, Wu Y. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells in animal serum-free media. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(28):4583-4587.

0 引言 Introduction

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新能力,且可在特定的培养条件下分化为造血细胞、骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌肉细胞等^[1],也可跨越胚层界限分化为神经细胞、肝细胞、胰岛细胞等。间充质干细胞最初主要在骨髓中分离得到,而后从骨、脂肪、羊膜、胎盘、脐带、脐血、牙髓、肌腱和骨骼肌等组织中也获得^[2-6]。间充质干细胞具有来源广泛,容易分离,能快速扩增等优点,以及具有较低免疫原性和免疫调节能力^[1,7-8],成为组织工程、再生医学和免疫抑制治疗领域重要的种子细胞来源^[9]。由于间充质干细胞是成体干细胞,在体内原始含量很少,为满足临床应用,需要在体外进行快速有效地扩增培养,同时还需保持其多向分化潜能和未分化状态,即非分化性增殖成为间充质干细胞进入临床阶段亟待解决的问题。

目前,体外扩增间充质干细胞最常使用添加胎牛血清的基础培养基。但是,胎牛血清属异种蛋白,可能含有动物携带的细菌、病毒、蛋白传染性疾病或朊病毒,因此用胎牛血清培养的间充质干细胞输入人体后,可能导致这些病原体的传播产生感染,具有潜在的危险。虽然扩增培养的细胞经洗涤可以减少异种蛋白的残留量,但是细胞内化的异种蛋白难以去除,常规制备的间充质干细胞残留牛血清蛋白含量达7-30 mg/10⁸个细胞,可能引起免疫反应、过敏反应和局部炎症反应。

为了解决培养基中的动物源性成分,目前研究试图采用人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解液以及化学成分明确无血清培养基等来替代胎牛血清扩增培养间充质干细胞^[10-16],以期寻找到合适的培养基添加成分。本文着重讨论了替代胎牛血清的其他添加剂的优缺点,对无动物源性成分培养基体外扩增间充质干细胞的研究进展做一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者应用计算机检索2004年1月至2014年4月中国期刊全文数据库及PubMed数据库,英文检索词为“mesenchymal (stromal) stem cells”, “animal serum-free media”, “humanized media”, “human serum”, “umbilical cord blood serum”, “platelet rich plasma”, “platelet lysate”, “defined medium”,中文检索词为“间充质干细胞、无动物血清培养基、人源性培养基、人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解液、化学成分明确无血清培养基”进行检索。

1.2 入选标准 ①内容与体外扩增间充质干细胞关系密切的文章。②文章论点论据可靠,针对性强。③对同一领域的文献选择近期发表或权威杂志的文献。

1.3 质量评估 初检得到258篇文献,其中英文文献148篇,中文文献110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41篇符合标准的文献。

2 结果 Results

2.1 人源性成分的培养基

2.1.1 人血清的培养基 越来越多的研究报道指出使用人血清可替代胎牛血清扩增人骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、滑膜间充质干细胞等^[11-12,14]。人血清中含有间充质干细胞生长所需的生长激素、必需蛋白(转铁蛋白,血清白蛋白和粘连蛋白等)、生长刺激因子、氨基酸和维生素等必要成分。将人自体血清作为培养基的添加物,培养出的间充质干细胞的形态与添加胎牛血清相似,并且明显缩短了群体倍增时间,添加胎牛血清培养间充质干细胞的群体倍增时间是76-89 h,添加人血清培养间充质干细胞的群体倍增时间是41-54 h^[17]。在间充质干细胞短期和长期培养中,使用人血清和胎牛血清培养的间充质干细胞生物学特性无明显差异,并表达间充质干细胞所有表面标记物,具有在体外诱导间充质干细胞成骨和成脂的分化能力。有研究报道,用人血清扩增培养其自体骨髓间充质干细胞,比胎牛血清培养的间充质干细胞扩增速度更快,脑卒中患者回输间充质干细胞后无明显不良反应^[18]。另报道用人血清扩增培养的间充质干细胞回输治疗急慢性移植物抗宿主病取得成功^[19]。但是,使用人血清也存在一些问题需要解决:第一,人血清中可能含有病原体,在间充质干细胞移植过程中发生病原体感染,因此,无论是自体或异体血清在使用之前,都应进行严格的检测。第二,血清捐献者的年龄直接影响其培养间充质干细胞的生长和分化能力^[20]。

2.1.2 含脐血清的培养基 人脐血具有来源广泛,采集方便,免疫原性低,不涉及伦理限制等优势。人脐血清富含干细胞生长、存活、增殖及分化所需的各种细胞因子,还含有丰富的刺激造血因子,因此可选用添加人脐血清的培养基对间充质干细胞进行培养。此外,人脐血清中已经确定的蛋白质有61种,尤以血清白蛋白和转铁蛋白的含量高^[21],人脐血清利于间充质干细胞的生长和增殖可能是因为这些蛋白质的促进作用。分别用添加体积分数为10%人脐血清和体积分数为10%胎牛血清的培养基进行间充质干细胞培养,细胞生长的倍增时间分

别为31.3 h和44.2 h, 这可能由于人脐血清高表达细胞周期调控分子D2, 从而加快细胞周期活动, 促进间充质干细胞的增殖^[22]。经添加人脐血清的培养基培养的间充质干细胞仍具有维持自我更新和持续复制的能力, 可得到近2 000倍扩增量的细胞^[20], 而添加胎牛血清的培养基培养的间充质干细胞, 在体外扩增后期就失去了细胞集落形成能力, 显示出细胞衰老的情况。人脐血清被认为是较好的胎牛血清替代物, 但是由于其成分的不确定性, 使其用于临床规模扩增间充质干细胞受到一定限制, 因此需要寻找一种成分明确的培养基扩增间充质干细胞。

2.1.3 富血小板血浆 富血小板血浆是通过离心人全血而得到的含高体积分数血小板的血浆, 与CaCl₂、凝血酶混合后被激活, 其中 α 颗粒释放多种生长因子, 如血小板源性生长因子、表皮生长因子、转化生长因子 β 、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和类胰岛素生长因子等, 各因子间发挥协同作用, 但机制尚不清。

一些研究者尝试用贫血小板血浆培养扩增人间充质干细胞, 结果发现贫血小板血浆并不支持间充质干细胞的扩增, 添加表皮生长因子、血小板源性生长因子和碱性成纤维细胞生长因子后的贫血小板血浆完全可以支持间充质干细胞的扩增和分化, 且不影响间充质干细胞的细胞表型等生物学特性, 进一步证明了表皮生长因子、血小板源性生长因子和碱性成纤维细胞生长因子是维持间充质干细胞生长的必需因子^[23]。

采用改良的富血小板血浆制备方法, 促进血小板中生长因子的释放, 即将加入肝素钠的全血通过液氮反复冻融, 用于对人骨髓间充质干细胞的体外培养扩增, 发现5%–10%的改良富血小板血浆对体外培养人骨髓间充质干细胞的增殖具有促进作用, 其对细胞的增殖促进作用具有浓度依赖性, 尤以10%浓度为佳, 该浓度可促进人骨髓间充质干细胞群落中的Stro-1⁺细胞亚群的增殖, 从而增强细胞群落的免疫抑制效应、均一性和原始性^[24]。一些临床研究者倾向使用自体富血小板血浆扩增以获得临床数量的人间充质干细胞, 这样更安全。人脐血可成为富血小板血浆的理想来源, 脐血富血小板血浆中的血小板源性生长因子AB/BB和碱性成纤维细胞生长因子的含量明显高于外周血富血小板血浆, 更有利于体外扩增间充质干细胞^[15]。

2.1.4 人血小板裂解液 血小板裂解液是富血小板血浆调整血小板浓度后, 经反复冻融裂解血小板后获得富含各种生长和免疫相关因子的裂解液。制备过程中未加入凝血酶、CaCl₂等激活剂引入异源成分, 不仅降低了免疫原性, 也降低了制备成本。用ELISA方法检测裂解后血浆各种因子浓度都明显高于裂解前^[25]。血小板源性生长因子和碱性成纤维细胞生长因子是维持间充质干细胞生长的必需因子, 但增加这两个因子浓度并不能高

效地促进间充质干细胞的扩增, 说明这两个因子为间充质干细胞扩增的必需因子, 但不是高效因子^[25]。有研究报告, 血小板源性生长因子、表皮生长因子、转化生长因子 β 1和碱性成纤维细胞生长因子的浓度较高, 约为全血中的17倍, 其活性可持续5–8 d, 在调节细胞增殖过程中起重要作用^[26–30]。研究已经证实血小板裂解液可以替代动物血清实现实验室级别或者大规模临床级别扩增人骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、脐带间充质干细胞、牙髓干细胞等^[11, 25, 31–35], 是目前临床应用规模扩增间充质干细胞最合适的胎牛血清替代品。

在细胞形态方面, 与胎牛血清比较, 5%血小板裂解液扩增的间充质干细胞形态更显细长, 折光性更好, 细胞直径更小, 而直径更小的优点是可增加单位面积的间充质干细胞的数目, 减少细胞培养耗材的使用量, 节省培养成本, 更有利于细胞进入人体后通过各种屏障。在扩增能力方面, 血小板裂解液能使间充质干细胞增殖更快, 汇合时间更短。血小板裂解液扩增的间充质干细胞有更强的成骨、软骨和脂肪分化的能力^[31]。应用浓度为7%血小板裂解液和体积分数为10%胎牛血清扩增羊膜来源间充质干细胞, 结果显示两种介质培养的羊膜来源间充质干细胞均为成纤维细胞样, 但是含7%血小板裂解液较含体积分数为10%胎牛血清的培养基扩增羊膜来源间充质干细胞所用传代时间更短, 这两种培养液培养的羊膜来源间充质干细胞均表达CD90、CD73和CD105, 不表达CD45、CD34、CD14、CD19和HLA-DR, 细胞分化的结果显示7%血小板裂解液培养的羊膜来源间充质干细胞具备向成骨细胞、成软骨细胞和成脂肪细胞分化的能力, 均符合间充质干细胞的特征^[36]。使用血小板裂解液可以有效地替代胎牛血清, 实现临床级间充质干细胞的扩增培养^[33, 35]。但一些研究发现血小板裂解液扩增的间充质干细胞对T、NK细胞增殖和细胞毒性功能抑制能力下降, 下调前列腺素E2分泌, 上调白细胞介素6、白细胞介素8和RANTES表达, 显示了血小板裂解液扩增的间充质干细胞在临床应用于免疫调节剂方面具有局限性^[37]。

2.2 化学成分明确无血清培养基 人血清、人脐血清、富血小板血浆和血小板裂解液的主要作用是给细胞提供生长增殖所需的激素、生长因子、转移蛋白和其他营养物质, 但存在缺点: ①成分不明确、血液制品具有批间差异, 不稳定, 且受供者年龄等影响。②血液制品存在传染病、未知疾病检测等质量控制难点, 使其具有潜在的风险。③血液来源有限。④人血清、人脐血清、富血小板血浆和血小板裂解液扩增效应的内在分子机制, 及其对间充质干细胞的分子学改变都有待更多的研究来揭示。⑤血小板相关膜抗原引发的体内免疫学反应也应引起重视。为避免上述缺点, 研究者提出了化学成分明确、无动物源成分和无血清的培养基, 通过像鸡尾酒式

的添加激素、无机盐、维生素、微量元素、氨基酸、白蛋白和生长因子(如碱性成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子和转化生长因子 β)等成分明确的培养基,在体外培养的间充质干细胞具有较长时间生长增殖,可维持间充质干细胞的主要细胞表型、分化和免疫调节功能特征^[38-39]。在原材料的选取上采用具有足够纯度的化学合成或者生物重组的原料(重组人胰岛素、重组人血清白蛋白和重组人生长因子等),既能做到严格意义上的化学成分明确,又能避免使用血液制品提取物成分。一些实验室自行配制化学成分明确的无血清培养基,它由基础培养基IMDM或DMEM/F12和替代血清的添加物组成。主要成分为亚硒酸钠、转铁蛋白、牛血清白蛋白、胰岛素、氯化可的松、重组人表皮生长因子和重组人碱性成纤维细胞生长因子等。为保证间充质干细胞的贴壁,采用了明胶包被细胞培养瓶,成功培养出了人骨髓间充质干细胞,但因为含有牛血清白蛋白和牛来源明胶,没有实现不含动物源成分的真正目的^[40]。化学组分明确的培养基也有一些不足:①需要在高密度下接种。②价格较昂贵。③间充质干细胞在培养过程中易受机械和化学因素的影响。目前,化学成分明确的无血清培养基还处于初级阶段,这种培养基扩增后的间充质干细胞的迁移能力、免疫原性、免疫调节能力和细胞因子的表达还需要许多研究来进行探索。

3 小结与展望 Conclusion and prospect

国际间充质及组织干细胞委员会提出了鉴定人来源间充质干细胞的3条最低标准^[41]:①塑料黏附性。②特定的细胞表面抗原表达。③多向分化潜能。要将间充质干细胞应用于临床,最关键的是进行体外大规模扩增培养,才能满足间充质干细胞应用于临床治疗的需要。扩增培养间充质干细胞的关键因素是培养基的选择,培养基需要维持间充质干细胞表观、功能和基因的稳定,并能维持多次传代其生物学特性不变。为了解决使用胎牛血清培养间充质干细胞的弊端,已经证实可以采用人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解液以及化学成分明确无血清培养基替代胎牛血清扩增间充质干细胞,但是这些培养基添加剂各有其优势和劣势,所以在大规模、系统地应用于临床治疗前,急需解决的问题就是扩增后的功能有效性与移植安全性。需要在获得稳定扩增效果的基础上构建一个立体全面、有效、安全的扩增间充质干细胞评价体系,保证间充质干细胞临床治疗安全化、规范化,这样才能推动间充质干细胞的临床应用进程。

作者贡献: 文章设计构思、资料收集由吴迪完成,吴迪成文,吴岩审校,吴迪对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 间充质干细胞-是在中胚层的早期发展中形成的多能干细胞,具有不断的自我更新、多向分化潜能、低免疫原性、免疫抑制作用和修复作用。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Hoogduijn MJ, Dor FJ. Mesenchymal stem cells: are we ready for clinical application in transplantation and tissue regeneration. *Front Immunol.* 2013;4:144.
- [2] Wang TH, Lee YS, Hwang SM. Transcriptome analysis of common gene expression in human mesenchymal stem cells derived from four different origins. *Methods Mol Biol.* 2011; 698:405-417.
- [3] Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev.* 2012;21(12):2189-2203.
- [4] Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):17986-18001.
- [5] Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. *Ann Saudi Med.* 2012;32(1):68-77.
- [6] Zou JP, Huang S, Peng Y, et al. Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds.* 2012;11(4):244-253.
- [7] Dash SN, Dash NR, Guru B, et al. Towards reaching the target: clinical application of mesenchymal stem cells for diabetic foot ulcers. *Rejuvenation Res.* 2014;17(1):40-53.
- [8] Pileggi A, Xu X, Tan J, et al. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(6): 672-681.
- [9] Zaher W, Harkness L, Jafari A, et al. An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. *Arch Toxicol.* 2014;88(5):1069-1082.
- [10] Walenda G, Hemedda H, Schneider RK, et al. Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(12):924-934.
- [11] Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009;27(9): 2331-2341.
- [12] 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.
- [13] Chieragato 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] 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.
- [15] Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials.* 2012;33(21):5308-5316.
- [16] Kishimoto S, Ishihara M, Mori Y, et al. Effective expansion of human adipose-derived stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on a fragmin/protamine nanoparticles-coated substratum with human platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013; 7(12):955-964.
- [17] Bertolo A, Mehr M, Janner-Jametti T, et al. An in vitro expansion score for tissue-engineering applications with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013. [Epub ahead of print]
- [18] Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain.* 2011;134(Pt 6): 1790-1807.
- [19] 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.
- [20] Jung S, Panchalingam KM, Wuerth RD, et al. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. *Biotechnol Appl Biochem.* 2012;59(2):106-120.
- [21] Song HJ, Zhang P, Guo XJ, et al. The proteomic analysis of human neonatal umbilical cord serum by mass spectrometry. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(11):1550-1558.
- [22] 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.
- [23] Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008;112(2):295-307.
- [24] 李斯翰, 段建民, 李洪涛, 等. 改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞增殖与免疫原性的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(49): 8505-8511.
- [25] Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy.* 2012;14(5):540-554.
- [26] Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, et al. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):665-676.
- [27] Yokota J, Chosa N, Sawada S, et al. PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- β -activated MEK-dependent manner. *Int J Mol Med.* 2014;33(3):534-542.
- [28] Jose S, Hughbanks ML, Binder BY, et al. Enhanced trophic factor secretion by mesenchymal stem/stromal cells with Glycine-Histidine-Lysine (GHK)-modified alginate hydrogels. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1955-1964.
- [29] Pallua N, Serin M, Wolter TP. Characterisation of angiogenetic growth factor production in adipose tissue-derived mesenchymal cells. *J Plast Surg Hand Surg.* 2014. [Epub ahead of print].
- [30] Contaldo C, Myers TJ, Zucchini C, et al. Expression levels of insulin receptor substrate-1 modulate the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and osteosarcoma cells. *Growth Factors.* 2014;32(1):41-52.
- [31] Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e68984.
- [32] Santo VE, Duarte AR, Popa EG, et al. Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. *J Control Release.* 2012;162(1):19-27.
- [33] 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.
- [34] Cholewa D, Stiehl T, Schellenberg A, et al. Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 2011; 20(9):1409-1422.
- [35] Naaijken BA, Niessen HW, Prins HJ, et al. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell Tissue Res.* 2012;348(1):119-130.
- [36] 董晶, 聂李平, 周宇, 等. 血小板裂解液快速扩增人羊膜来源间充质干细胞[J]. *微循环学杂志*, 2012, 22(4): 13-16.
- [37] 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.
- [38] van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24(4):1053-1063.
- [39] Mimura S, Kimura N, Hirata M, et al. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 2011;55(2):181-187.
- [40] Hudson JE, Mills RJ, Frith JE, et al. A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):77-87.
- [41] 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.