

三维培养小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性

贺鑫, 李雪, 鲍会静, 王仁峰, 刘运德, 宋士伟(天津医科大学医学检验学院, 天津市 300000)

文章亮点:

实验采用壳聚糖包被的培养板培养小鼠骨髓间充质干细胞, 使其呈现三维球体的生长状态, 并且重点研究了三维球体培养对于小鼠骨髓间充质干细胞凋亡和衰老等方面的作用, 发现其除了可以维持骨髓间充质干细胞的干性以外, 还可以显著延缓其凋亡和衰老的进程。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 壳聚糖; 三维球体; 干性; 凋亡; 衰老

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 壳聚糖; 细胞凋亡; 细胞衰老

基金资助:

天津医科大学科学基金(2012KYQ12), 课题名称: 《间充质干细胞对移植排斥反应个体树突状细胞功能影响及作用机制》; 国家高技术研究发展计划项目(2012AA021003), 课题名称: 《骨髓间充质干细胞诱导耐受性树突状细胞产生的策略与机制》

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞具有自我更新和多向分化潜能而被用于多种疾病治疗及研究, 但是在目前的培养条件下, 其极易发生老化和自分化而失去应用价值。

目的: 研究三维球体培养对骨髓间充质干细胞干性及衰老的影响。

方法: 取 3 周龄 C57/B6 小鼠, 分离培养骨髓间充质干细胞, 分别接种于包被有壳聚糖的培养板和普通培养板。培养 5 d 后分别收集两组细胞, 流式细胞术检测细胞表型及干性相关标志分子, 应用 PI 和 Annexin-V 染色检测细胞凋亡, β -Gal 染色鉴定衰老。

结果与结论: 小鼠骨髓间充质干细胞培养第 3 天就可以聚集成球状生长, 球体状生长的细胞干性相关标志分子 CD44 和 Sca-1 表达高于普通培养细胞, PI 和 Annexin-V 染色可见球体培养细胞凋亡明显减少, 且通过 β -Gal 染色可见球体状态生长的细胞无明显衰老。上述结果表明, 三维球体培养技术有益于维持间充质干细胞的干性, 减少其凋亡并延缓衰老。

贺鑫, 李雪, 鲍会静, 王仁峰, 刘运德, 宋士伟. 三维培养小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7227-7232.

Effects of three-dimensional spheroid culture system on biological characteristics of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

He Xin, Li Xue, Bao Hui-jing, Wang Ren-feng, Liu Yun-de, Song Shi-wei (School of Medical Examination, Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells have attracted widespread attention for the capabilities of self-renewal and multi-differentiation, which have been used in treatment of various diseases.

OBJECTIVE: To study the effect of three-dimensional spheroid culture system on the stemness and senescence of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow of C57/B6 mice, 3 weeks old, and cultured onto the culture plates coated with or without chitosan. After 5 days of culture, the cell phenotype and expression of stemness related markers CD44 and Sca-1 were analyzed by flow cytometry. PI and Annexin-V staining were used to detect cell apoptosis. Also, β -Gal staining was applied for identification of aging.

RESULTS AND CONCLUSION: The mouse mesenchymal stem cells began to form spheroids on day 3. The stemness-related markers, including CD44 and Sca-1, expressed higher in spheroid mesenchymal stem cells than the cells under normal culturing. Compared with the normal culture group, the apoptosis and senescence of cells from spheroid culture were lower. The results indicate that the formation of spheroids on chitosan films can increase the stemness, decrease the apoptosis and slow the senescence of mesenchymal stem cells.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; chitosan; apoptosis; cell aging

Funding: the Science Foundation of Tianjin Medical University, No. 2012KYQ12; the National High Technology Research and Development Program of China, No. 2012AA021003

贺鑫, 男, 1988 年生, 山东省淄博市人, 汉族, 主要从事间充质干细胞诱导耐受性树突状细胞形成机制的研究。

通讯作者: 刘运德, 教授, 研究生导师, 天津医科大学医学检验学院, 天津市 300000

并列通讯作者: 宋士伟, 教授, 硕士, 天津医科大学医学检验学院, 天津市 300000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.45.003

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)45-07227-06

稿件接受: 2014-10-18

He Xin, School of Medical Examination, Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China

Corresponding author: Liu Yun-de, Professor, Master's supervisor, School of Medical Examination, Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China

Corresponding author: Song Shi-wei, Master, Professor, School of Medical Examination, Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China

Accepted: 2014-10-18

He X, Li X, Bao HJ, Wang RW, Liu YD, Song SW. Effects of three-dimensional spheroid culture system on biological characteristics of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7227-7232.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一种具有自我复制和多向分化能力的多能干细胞,最早发现于骨髓,随后研究者分别从脂肪、脐血等多种组织中分离出该细胞^[1-2]。间充质干细胞在体外特殊的诱导条件下可以分化为骨、软骨、脂肪以及其他组织,其具有来源广泛、取材容易、体外增殖快等特点,可用作神经组织、骨组织工程等的种子细胞,并且已应用于多种疾病的治疗^[3-5]。但是在目前体外培养条件下,间充质干细胞的性状很难保持稳定,容易发生衰老和自分化^[6],从而导致间充质干细胞的自我复制以及多向分化等能力受损^[7-9]。因此急需一种可以延缓间充质干细胞衰老并且能够维持其干性的培养方法。

人体内的细胞在正常生理状态下多以三维结构存在,以保持其相应的活性与功能^[10]。在一定的培养条件下,细胞在体外会聚集成球形生长,这样有助于细胞功能的表达与发挥,同时还可以增强细胞抵抗外界不良因素干扰的能力^[11-15]。

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,是众多天然多糖中惟一的碱性多糖^[16-17],具有来源广泛、价格便宜等优点,已广泛应用于生物领域^[18];同时由于其具有良好的组织相容性,也被广泛应用于伤口敷料、药物缓释系统等^[19-21]。壳聚糖的结构和功能与葡萄糖胺聚糖相似,所以还被广泛应用于组织工程领域^[22]。近年来科学家们又发现,在壳聚糖包被的培养板上,黑色素细胞等可以呈三维球体结构生长,使得其黏附以及增殖的能力得到了增强^[23]。

本实验拟将小鼠骨髓间充质干细胞接种于预包被壳聚糖的培养板上,首先观察骨髓间充质干细胞是否能呈现三维球体的结构,进而研究球体状态生长对骨髓间充质干细胞干性、衰老和凋亡的影响,力争找到一种可以为临床应用和科学研究提供稳定合格细胞来源的培养方法。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学观察实验。

时间及地点: 2013至2014年在天津医科大学医学检验学院中心实验室进行。

材料:

实验动物: 3周龄雄性C57/B6小鼠20只,体质量15 g左右,均购自解放军军事医学科学院实验动物中心。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离、培养: 取3周龄小鼠,脱颈法处死后浸泡于体积分数为75%乙醇中10 min。在无菌条件下分离双侧下肢,去掉肌肉和组织,分离出股骨和胫骨,剪掉股骨和胫骨两端,用带有针头的注射器吸取完全培养基,慢慢的将骨髓全部冲出并收集到一无菌离心管。离心

小鼠骨髓来源间充质干细胞分离培养实验所需主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
壳聚糖	济南海得贝公司
DMEM/F12培养基	Hyclone
胎牛血清	Gibco
胰蛋白酶	Amresco
荧光标记抗小鼠单抗CD44-PE、Sca-1-FITC、CD34-PE、CD45-PE、CD90.2-PECy7, 同型阴性对照IgG-FITC、IgG-PE、IgG-PECy7	BD Biosciences
Hochest33342染液	Invitrogen
PI-Annexin-V染色试剂盒	南京凯基生物公司
细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒	上海碧云天生物公司
红细胞裂解液	北京索莱宝公司
流式细胞仪	BD Biosciences
荧光显微镜	Nikon

后加入红细胞裂解液,室温下裂解2 min,之后1 200 r/min离心3 min。用含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 g/L链霉素的DMEM/F12培养基重悬细胞后置于培养瓶中,放置在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。3 d后半量换液,此后每隔3 d换液1次。当细胞达到80%–90%融合度时,用胰酶消化传代,并将细胞转移到新的培养瓶中。细胞生长状态稳定后,进行后续实验。

包被壳聚糖培养板的制备及细胞接种: 取适量壳聚糖溶解于1 mol/L的醋酸中,使终质量浓度为20 g/L。每个12孔板培养孔中加入200 μL上述溶液,摇匀至全部覆盖孔底后将培养板置于60 °C烘箱中烘干24 h。完全烘干后每孔加入0.1 mol/L的NaOH溶液中和15 min,之后将培养板浸泡于体积分数为75%乙醇中12 h,最后紫外灯照射过夜。取第3代小鼠骨髓间充质干细胞,以1×10⁹ L⁻¹细胞浓度接种于上述预包被壳聚糖的培养板上,另取未包被的培养板作为对照组,接种同等浓度的细胞。之后将细胞放置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养,每隔2 d换新鲜完全培养基,至第5天收获细胞进行后续实验。

细胞免疫表型鉴定: 取上述培养5 d的两组细胞,用胰酶消化后制备成单细胞悬液。用PBS洗2次后计数,取5×10⁵个细胞重悬于100 μL PBS中,避光条件下加入PE-CD44、FITC-Sca-1、PE-CD34抗体和IgG同型对照,4 °C避光孵育30 min, PBS洗1次,用500 μL PBS重悬,流式细胞仪检测分析。

流式细胞术检测细胞凋亡: 收集细胞后PBS洗1遍,用1×Annexin-V binding buffer调整细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹。取100 μL细胞悬液加入到新的EP管中,并加入5 μL

FITC-Annexin-V和5 μL PI染液, 室温下避光孵育15 min, 最后加入400 μL 1 \times Annexin-V binding buffer, 流式细胞仪检测分析。

荧光显微镜观察细胞凋亡: 取对数生长期细胞, 以 $1\times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于两种培养板中。培养5 d后去除培养基用PBS洗2遍, 加入100 μL PBS; 加入适量1 g/L Hoechst 33342染液, 使终质量浓度为5 mg/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色15 min, 于荧光显微镜下观察。

光学显微镜观察细胞衰老: 取对数生长期细胞, 以 $1\times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于两种培养板中。培养5 d后弃去培养基, PBS洗1遍, 加500 μL β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定15 min, 吸除固定液, 用PBS洗涤细胞3次。加入过500 μL 染色工作液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用普通光学显微镜观察。

主要观察指标: 倒置显微镜观察细胞形态, 流式细胞仪检测细胞表面标志物及细胞凋亡情况, 荧光显微镜观察细胞活力。

统计学分析: 第一作者采用Graph prism 6.0版本软件进行统计处理。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用配对 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养 接种后3 d, 倒置显微镜观察可见有少数集落形成(图1A); 第7天左右可以形成明显的细胞克隆(图1B)。传代后细胞生长速度较快, 形态均一, 呈梭形或成纤维状(图1C)。

2.2 细胞免疫表型鉴定 流式细胞仪分析结果表明(图2), 分离培养的第3代细胞表达CD44(84.8%)、CD90.2(75.4%), 不表达CD34(0.382%)和CD45(1.87%), 说明培养得到的细胞是骨髓间充质干细胞。

2.3 小鼠骨髓间充质干细胞三维球体状态的形成 骨髓间充质干细胞接种于包被有壳聚糖的培养板上第1天即可见细胞开始聚集(图3A); 第3天可见细胞聚集成明显的球体(图3B); 培养至第5天, 仍呈球体状态且悬浮生长。

2.4 球体状态生长对干性相关标志分子的影响 包被壳聚糖的培养板上呈三维球体状态生长的骨髓间充质干细胞的干性相关标志分子CD44和Sca-1的表达[(69.3 \pm 5.7)%,(27.9% \pm 3.0)%]明显高于普通培养组[(54.4 \pm 4.3)%,(8.3 \pm 1.0)%], 差异有显著性意义($P < 0.05$)(图4)^[24]。

2.5 球体状态生长对细胞凋亡的影响 在荧光显微镜下可见: 三维球体状态的骨髓间充质干细胞仅有少量凋亡细胞(图5A); 普通培养板上贴壁生长的细胞则有相对较多的凋亡细胞(图5B)。同时, 经过PI和Annexin-V染色后, 流式细胞仪定量分析也验证了上述荧光染色的结果, 即三维球体状态生长的骨髓间充质干细胞(图5C)凋亡的比例要明显低于对照组($P < 0.05$, 图5D)。

2.6 球体状态生长延缓细胞的衰老 小鼠骨髓间充质干细胞与人和大鼠的不同, 极容易衰老。采用球体培养后

可见: 仅有少数细胞呈衰老状态(图6A), 而对照组中二维平面生长的细胞, 衰老现象非常明显(图6B)。由此可见, 采用三维球体培养可以明显延缓小鼠骨髓间充质干细胞的衰老。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞是干细胞家族的重要成员, 具有多向分化的潜能, 在特定的诱导条件下可以分化为脂肪、软骨、骨等^[25]。除此之外, 骨髓间充质干细胞还具有免疫调节功能, 其对于树突状细胞的成熟、分化及其抗原呈递功能都有明显的抑制作用^[26-27]。近年来, 由于骨髓间充质干细胞具有较高的体外基因转染率以及回输体内后可以高效稳定表达外源性基因的特性, 其已经成为组织工程中与支架材料相复合最多的种子细胞, 而被广泛应用于治疗骨质疏松、骨组织发育不良等疾病以及组织修复工程等^[28]。

细胞在人体中呈三维状态生长, 而目前常用的二维平面培养环境改变了细胞在自然状态下的生长方式。使得骨髓间充质干细胞在体外培养中极易发生衰老、凋亡以及自分化, 这就在一定程度上降低了骨髓间充质干细胞的分化潜能、活性以及其干性的表达^[29], 削弱了骨髓间充质干细胞的归巢能力和细胞因子的分泌能力^[30]。目前, 国内外的研究学者认为, 引起造血干细胞等衰老的原因和机制有很多种, 主要包含细胞的内源性机制和外源微环境的作用两个方面, 例如DNA损伤、端粒缩短、活性氧水平升高、表观遗传修饰、细胞极性改变、代谢及造血微环境等方面^[7]。

已有的研究发现, 三维球体培养可以增强骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化能力^[8, 30], 其分化、分泌细胞因子和修复受损组织的能力也得到了明显的增强^[31-33]; 即使在无血清培养基中, 骨髓间充质干细胞也可以分泌更多的基质蛋白和细胞因子^[31], 更好的抵御不良环境的影响^[34]。Bartosh等^[35]的研究还表明, 三维球体状态培养的骨髓间充质干细胞移植到心脏受损部位后, 可以抵御缺氧环境, 并能分泌更多的促进血管生成因子, 也能更好的向血管分化。Bhang等^[36]还发现, 在球体状态下培养的骨髓间充质干细胞向受损组织迁移和抗炎能力均有增强。由此可以看出, 三维球体生长状态的骨髓间充质干细胞功能有明显的增强, 但是其对于骨髓间充质干细胞干性的维持以及抗衰老、抗凋亡等方面是否同样发挥有积极的作用尚无报道。而骨髓间充质干细胞早期出现的衰老乃至凋亡是限制其应用的主要原因, 因此实验针对三维球体培养对于骨髓间充质干细胞的干性, 特别是对于延缓骨髓间充质干细胞凋亡和衰老是否发挥作用进行研究和探讨。

本实验将壳聚糖包被于普通培养板上, 在这种培养板上骨髓间充质干细胞可以呈三维球体状态生长。在接种后的第1天就出现明显的聚集生长的趋势, 集落之间空隙加大。第3天就开始形成明显的球体形态, 大小不一, 分部均匀, 且由半贴壁状态逐渐转变为悬浮状态, 培养到第5天, 仍呈球体



图 1 原代培养小鼠骨髓间充质干细胞

Figure 1 The primary culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为全骨髓贴壁培养 3 d 的照片($\times 4$), 镜下可见有少数细胞集落形成; B 为贴壁培养 7 d 的照片($\times 4$), 可见细胞集落明显变大; C 为第 2 代培养第 3 天的照片($\times 10$), 可见细胞形态较为均一, 呈成纤维状。

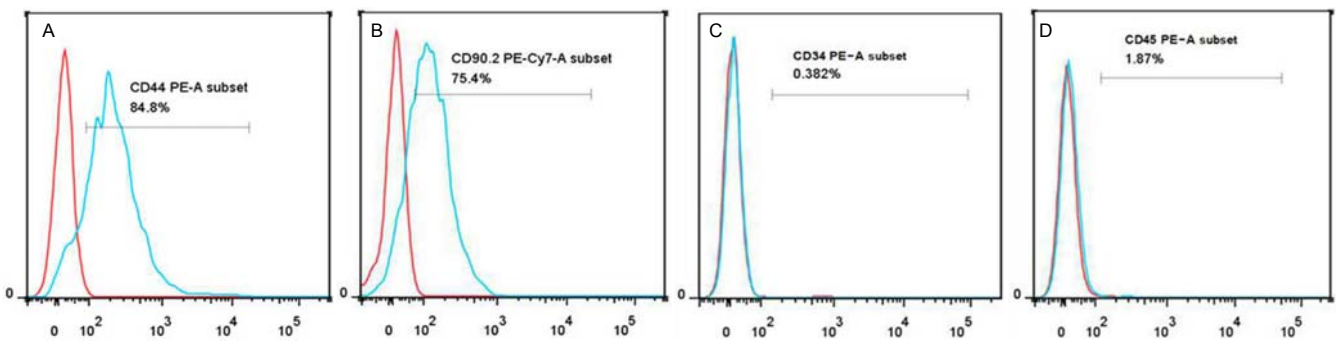


图 2 小鼠骨髓间充质干细胞表面分子标志表达

Figure 2 Surface molecular markers of mouse bone marrow mesenchymal stem cells tested by flow cytometer

图注: 图 A-D 分别为流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面分子 CD44(84.8%)、CD90.2(75.4%)、CD34(0.382%)和 CD45(1.87%)的表达情况。图中蓝色线为样品管结果, 红色线为同型对照管结果。

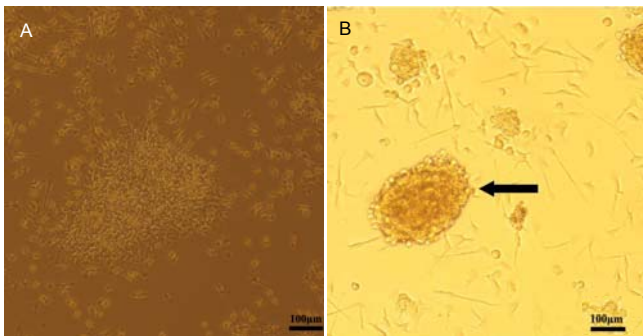


图 3 小鼠骨髓间充质干细胞呈球体状态($\times 10$)

Figure 3 The mouse mesenchymal stem cells formed spheroids ($\times 10$)

图注: 图中 A 为接种到包被壳聚糖的培养板第 1 天的骨髓间充质干细胞, 可见细胞已经开始聚集成堆; B 为培养 3 d 时已经形成明显的球体状态(箭头所示), 四周仅有少数散在贴壁生长的细胞。

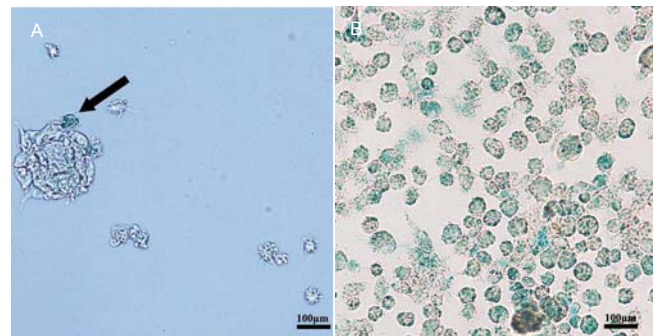


图 6 球体状态生长抑制细胞衰老($\times 10$)

Figure 6 Spheroidal state inhibited the senescence of bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 10$)

图注: 通过 β -Gal 染色可以看出: 小鼠骨髓间充质干细胞在三维球体状态下生长时, 仅有极少数细胞呈现衰老状态(图 A, 箭头所示染色呈现绿色细胞), 而在二维贴壁状态下生长的细胞则有较多衰老细胞(图 B)。

状态, 余下保持贴壁状态的细胞形态良好, 老化或凋亡现象较少。将培养 5 d 之后的两组细胞分别收集后, 利用流式细胞仪检测其干性相关标志分子 CD44 和 Sca-1 的表达情况, 可以看出, 对照组细胞表面两种分子的表达有明显的降低, 这说明球体状态可以保持骨髓间充质干细胞的干性。

体外的这种三维球体生长方式不仅可以保持骨髓间充质干细胞的干性, 更重要的是可以减少其凋亡。为了验证这一结论, 实验分别将两组细胞进行 PI 和 Annexin-V 染色后用

流式细胞仪检测以及进行 Hoechst 33342 染色后用荧光显微镜观察, 可以明显的看出两组凋亡的细胞比例有明显的差别: 球体状态下的骨髓间充质干细胞仅有少数细胞发生了凋亡而呈现亮蓝色; 而反观对照组的细胞, 可以看出大多数的细胞呈现亮蓝色, 说明凋亡的细胞占较大的比例; 同样的, 通过细胞凋亡检测的结果也可以看出, 对照组中凋亡的细胞数目要高于三维球体培养的细胞。通过上述结果可以说明, 三维球体状态生长延缓了骨髓间充质干细胞的凋亡。

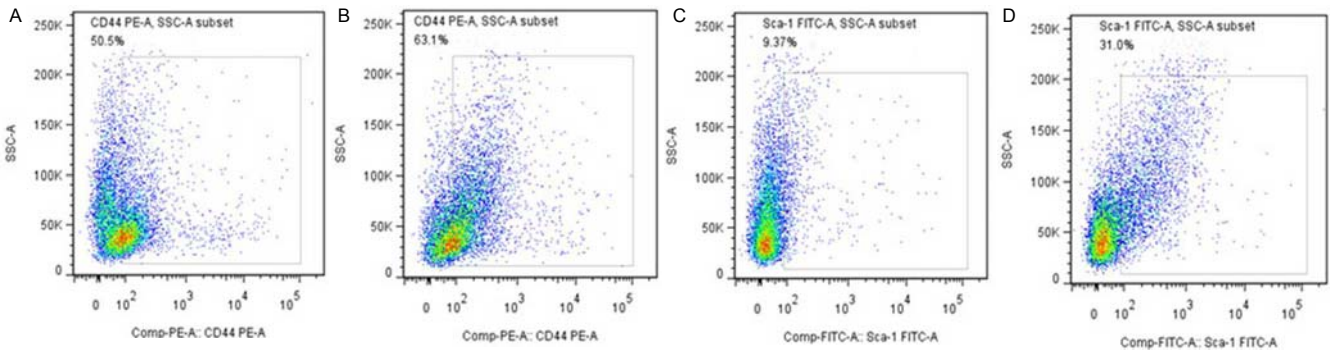


图 4 小鼠骨髓间充质干细胞干性标志表达分析

Figure 4 Stemness makers of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图 A, C 所示为普通培养组骨髓间充质干细胞干性相关标志分子 CD44 和 Sca-1 表达情况; 图 B, D 所示为三维球体培养状态下骨髓间充质干细胞干性相关标志分子 CD44 和 Sca-1 的表达情况。三维球体培养组细胞 CD44 和 Sca-1 标志分子的表达明显多于普通培养组($P < 0.05$)。

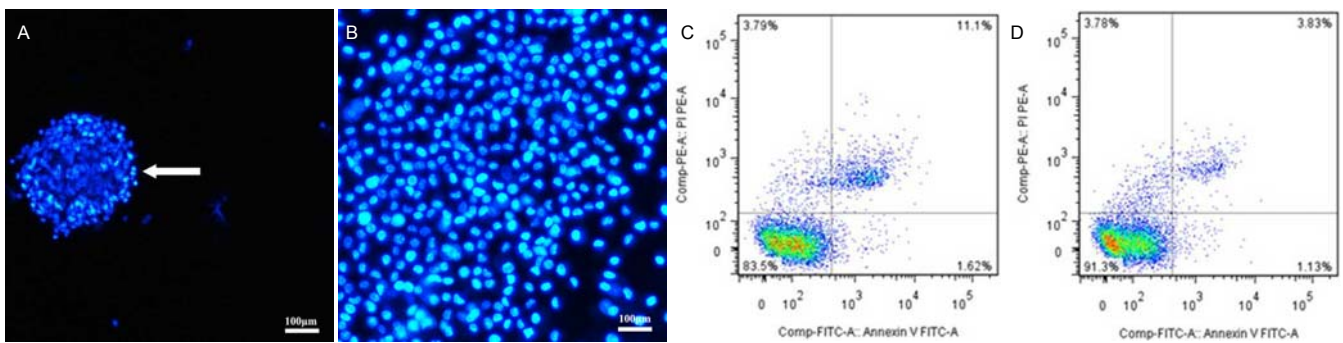


图 5 球体状态生长降低骨髓间充质干细胞的凋亡

Figure 5 Spheroidal state decreased the apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图 A 为 Hoechst33342 染色显示三维球体状态生长的骨髓间充质干细胞凋亡情况($\times 10$), 可见仅有少数细胞凋亡(箭头所示的亮蓝色细胞); 而图 B 所示的二维状态生长的骨髓间充质干细胞, 有较多的细胞都呈现出了凋亡状态($\times 10$); 图 C, D 所示为 PI 和 Annexin-V 双染显示两组细胞凋亡情况, 二维状态(图 C)生长的晚期凋亡的细胞比例(11.1%)明显高于三维球体状态(图 D)生长的骨髓间充质干细胞(3.83%)($P < 0.05$)。

绝大多数正常细胞在不能分裂后就进入衰老状态, 此时细胞仍然是存活的, 但细胞的基因和蛋白的表达谱发生了很大改变。衰老的细胞不能在一些常规的刺激下再诱导细胞分裂, 并且衰老细胞的细胞周期分布也比较特殊, 不同于一些损伤诱导的细胞休眠, 也不同于细胞生长接触抑制的情况。衰老细胞通常体积变大, 在弱酸性条件下 β -半乳糖苷酶高表达。因此采用 β -半乳糖苷酶染色, 观察两组细胞在体外培养环境下是否会过早的出现衰老, 通过染色结果可以看出, 二维状态下生长的细胞, 大部分呈现出衰老细胞所具有的绿色, 而三维球体状态下的细胞仅有几个细胞因衰老而被染成绿色。

对于干细胞的研究主要包括自我复制和分化能力, 其中分化能力是干细胞非常重要的一个特点。已有研究已经证明, 三维球体培养可以提高间充质干细胞等各种干细胞的分化能力^[8-9, 30], 其经过三维球体方式培养后成脂和成骨的能力明显高于普通培养的间充质干细胞。

本实验采用包被壳聚糖薄膜的培养板培养骨髓间充质干细胞, 可以使骨髓间充质干细胞呈现三维球体状态, 并且通过实验可以看出, 这种培养方式不仅可以保持骨髓间充质干细胞的干性, 还降低了细胞凋亡比例并延缓了细胞

衰老进程。因此, 三维球体状态培养有益于间充质干细胞更好的发挥其在科研及临床中的应用价值。

致谢: 感谢天津医科大学医学检验学院申艳娜等老师的帮助, 以及于晓旭、周鹏飞和胡亚慧等同学的支持。

作者贡献: 第一作者负责实验实施及成文, 第二作者负责实验设计及审校, 第三、四作者参与实验相关检测, 第一作者及通讯作者对实验负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 三维球体培养-指在体外细胞培养中, 通过特定的材料或方法使细胞呈球体悬浮状态生长的培养方式。

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] Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(4):735-749.

- [2] Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005; 5(12):1571-1584.
- [3] 李晓龙, 穆长征, 马云胜. 胶原-壳聚糖支架材料与间充质干细胞的组织相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复.* 2011, 15(8): 1377-1380.
- [4] 方志辉, 谭金海, 曾宪涛, 等. 骨髓间充质干细胞与多种支架材料复合效果的系统评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复.* 2011, 15(49): 9249-9253.
- [5] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):418-429.
- [6] 张永森, 杨利敏. 壳聚糖薄膜培养对间充质干细胞干性标记基因的影响[J]. *中国临床药理学杂志.* 2013, 29(7):534-536.
- [7] 安瑞, 易微微, 鞠振宇. 造血干细胞衰老的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展.* 2014, 41(3): 238-246.
- [8] Huang GS, Dai LG, Yen BL, et al. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials.* 2011;32(29):6929-6945.
- [9] Wang W, Itaka K, Ohba S, et al. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2009;30(14):2705-2715.
- [10] 王婵, 戴应, 郭永龙, 等. 脂肪干细胞的三维球形培养[J]. *中国组织工程研究.* 2014, 18(6):872-879.
- [11] Lin SJ, Jee SH, Hsiao WC, et al. Enhanced cell survival of melanocyte spheroids in serum starvation condition. *Biomaterials.* 2006;27(8):1462-1469.
- [12] Young TH, Lee CY, Chiu HC, et al. Self-assembly of dermal papilla cells into inductive spheroidal microtissues on poly(ethylene-co-vinyl alcohol) membranes for hair follicle regeneration. *Biomaterials.* 2008;29(26):3521-3530.
- [13] Ohkura T, Ohta K, Nagao T, et al. Evaluation of Human Hepatocytes Cultured by Three-dimensional Spheroid Systems for Drug Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(5):373-378.
- [14] Shao HJ, Lee YT, Chen CS, et al. Modulation of gene expression and collagen production of anterior cruciate ligament cells through cell shape changes on polycaprolactone/chitosan blends. *Biomaterials.* 2010;31(17): 4695-4705.
- [15] Green JA, Yamada KM. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(13):1293-1298.
- [16] Dhandayuthapani B, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):264-272.
- [17] Gooday GW. Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS.* 1999;87:157-169.
- [18] Cao X, Deng W, Wei Y, et al. Incorporating pTGF- β 1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation. *Eur Cell Mater.* 2012;23:81-93.
- [19] Gârlea A, Melnig V, Popa MI. Nanostructured chitosan-surfactant matrices as polyphenols nanocapsules template with zero order release kinetics. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(4):1211-1223.
- [20] Pountos I, Corscadden D, Emery P, et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury.* 2007;38 Suppl 4:S23-33.
- [21] 宋炳生, 钟晓峰. 甲壳质和壳聚糖治疗外伤的进展[J]. *中国生化药物杂志.* 2003, 24(4):213-214.
- [22] Huang GS, Dai LG, Yen BL, et al. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials.* 2011;32(29): 6929-6945.
- [23] Lin SJ, Jee SH, Hsiao WC, et al. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. *Biomaterials.* 2005; 26(12):1413-1422.
- [24] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004;103(5):1662-1668.
- [25] Spaggiari GM, Moretta L. Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;130:199-208.
- [26] English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett.* 2008;115(1):50-58.
- [27] Aldinucci A, Rizzetto L, Pieri L, et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J Immunol.* 2010;185(9):5102-5110.
- [28] Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, et al. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56(1):177-187.
- [29] Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials.* 2012;33(6):1748-1758.
- [30] Saleh FA, Whyte M, Genever PG. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *Eur Cell Mater.* 2011;22: 242-257.
- [31] Kapur SK, Wang X, Shang H, et al. Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. *Biofabrication.* 2012;4(2):025004.
- [32] Dromard C, Bourin P, André M, et al. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp Cell Res.* 2011;317(6):770-780.
- [33] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2): 418-429.
- [34] Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(31):13724-13729.
- [35] Bartosh TJ, Wang Z, Rosales AA, et al. 3D-model of adult cardiac stem cells promotes cardiac differentiation and resistance to oxidative stress. *J Cell Biochem.* 2008;105(2): 612-623.
- [36] Bhang SH, Cho SW, La WG, et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials.* 2011;32(11): 2734-2747.