

适合人肌母细胞的无血清培养基

王琳^{1,2,3}, 刘谋元^{1,2}, 周立冬^{1,2}, 刘理金^{1,2,3}, 刘爱兵^{1,2} (1武警总医院医学实验中心, 北京市 100039; 2灾害救援医学北京市重点实验室, 北京市 100071; 3辽宁医学院, 辽宁省锦州市 121001)

文章亮点:

1 目前实验室对人肌母细胞的培养通常应用一定浓度的胎牛血清, 然而胎牛血清的应用都需经过复杂而繁琐的筛选, 耗费成本, 且批间差异较大, 不利于培养工艺的的稳定。细胞培养规则表明, 不建议含有动物源性成分的培养基在临床应用。

2 文章通过 3 种不同培养体系(含胎牛血清培养基、间充质干细胞无血清培养基、自制无血清培养基)对肌母细胞体外培养, 探索出一种能够满足人肌母细胞临床移植需要的无血清培养基。结果表明, 自制无血清培养基组可有效用于肌母细胞的培养, 在促进肌母细胞早期贴壁、增殖上还需进一步优化。

关键词:

组织构建; 组织工程; 肌母细胞; 胎牛血清; 无血清; 培养基; 血清替代物; 谷氨酰胺; 增殖; 细胞培养

主题词:

肌纤维母细胞; 幼牛血清; 培养基

摘要

背景: 肌母细胞体外培养大多使用添加胎牛血清培养基, 存在很多不足, 开发无血清培养基, 更加稳定、安全、经济, 有广泛的应用前景。

目的: 初步探索适合人肌母细胞培养的无血清培养基。

方法: 配制含胎牛血清培养基 (DMEM/F12 1:1 添加胰岛素样生长因子 1、碱性成纤维细胞生长因子和体积分数 20%胎牛血清), 间充质干细胞无血清培养基组(无血清培养基、2%血清替代物、2 mmol/L L-谷氨酰胺, 人脐带间充质干细胞, 细胞纯度大于 99%, UltraCULTURE™ 添加血清替代物, 谷氨酰胺)。自制无血清培养基组(Gibco™ 添加胰岛素样生长因子 1, 碱性成纤维细胞生长因子, 谷氨酰胺)。3 种培养基分别对人肌母细胞分别进行培养, 观察肌母细胞的形态、免疫组织化学的鉴定, 计算克隆的形成率, 绘制细胞生长的曲线, MTT 检测肌母细胞的活性, 比较 3 种培养基培养肌母细胞增殖、分化的差异。

结果与结论: 各组细胞形态上无明显差异; 各组免疫组织化学鉴定肌母细胞纯度均达 99%; 含胎牛血清培养基组和自制无血清培养基组克隆形成率显著高于间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$), 含胎牛血清培养基组克隆形成率显著高于自制无血清培养基组($P < 0.01$); 含胎牛血清培养基组与自制无血清培养基组细胞数远高于间充质干细胞无血清培养基组; 自制无血清培养基组细胞活性显著高于含胎牛血清培养基组和间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$)。自制无血清培养基组可有效用于肌母细胞的培养, 在促进肌母细胞早期贴壁、增殖上还需进一步优化。

王琳, 刘谋元, 周立冬, 刘理金, 刘爱兵. 适合人肌母细胞的无血清培养基[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(51): 8271-8275.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.51.013

Serum-free medium suitable for human myoblast culture

Wang Lin^{1,2,3}, Liu Mou-yuan^{1,2}, Zhou Li-dong^{1,2}, Liu Li-jin^{1,2,3}, Liu Ai-bing^{1,2} (1Experiment Center, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2Beijing Municipal Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100071, China; 3Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Extensive use of fetal bovine serum (FBS) medium to culture myoblasts *in vitro* has many disadvantages. To develop a more stable, safe, economical serum-free medium that has broad application prospect is indispensable.

OBJECTIVE: To preliminarily explore the serum-free medium suitable for the cultivation of human myoblast.

METHODS: Three different culture media were made: FBS culture medium (DMEM/F12 containing insulin-like growth factor and basic fibroblast growth factor at a ratio of 1:1 and 20% FBS), serum-free medium of mesenchymal stem cells (MSCs; serum-free medium, 2% serum replacement, 2 mmol/L L-glutamine, human umbilical cord-derived MSCs with a purity of > 99%, UltraCULTURE™ containing serum replacement and glutamine), and self-made serum-free medium (Gibco™ containing insulin-like growth factor-1, basic fibroblast growth factor, and glutamine). These three media were used to culture human myoblasts respectively. Human myoblasts were observed morphologically and identified immunohistochemically. Colony forming efficiency was

王琳, 女, 1991 年生, 河南省商丘市人, 汉族, 辽宁医学院在读硕士, 主要从事临床检验诊断学的研究。

通讯作者: 刘谋元, 技师, 武警总医院医学实验中心, 北京市 100039

并列通讯作者: 刘爱兵, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 武警总医院医学实验中心, 北京市 100039

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)51-08271-05

稿件接受: 2015-10-12

http://www.crter.org

Wang Lin, Studying for master's degree, Experiment Center, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; Beijing Municipal Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100071, China; Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Liu Mou-yuan, Technician, Experiment Center, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; Beijing Municipal Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100071, China

Corresponding author: Liu Ai-bing, Master, Chief physician, Master's supervisor, Experiment Center, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; Beijing Municipal Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100071, China

Accepted: 2015-10-12

calculated, growth curve was drawn, and viability of human myoblasts was detected using MTT test. Proliferation and differentiation of human myoblasts cultured in the three media were compared and analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no obvious difference in the morphology of the cells among different groups. The purification rate of human myoblasts was up to 99% in each group. The colony forming efficiency of FBS group and self-made serum-free medium group was significantly higher than that of MSCs group ($P < 0.01$), and the colony forming efficiency of FBS group was significantly higher than that of self-made serum-free medium group ($P < 0.01$). The viable cell count in the FBS group and self-made serum-free medium group were much higher than that of MSCs group. The cell activity of self-made serum-free medium group was significantly higher than that of FBS group and MSCs group ($P < 0.01$), while there was no significant difference between FBS group and MSCs group ($P > 0.05$). Self-made serum-free medium is effective for the culture of myoblasts, and further studies on the early adhesion and proliferation of human myoblasts are necessary.

Subject headings: Myofibroblasts; Actihaemyl; Culture Media

Wang L, Liu MY, Zhou LD, Liu LJ, Liu AB. Serum-free medium suitable for human myoblast culture. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(51): 8271-8275.

0 引言 Introduction

肌母细胞是已分化的最原始的肌性细胞, 能够彼此天然融合和核传递, 产生收缩蛋白, 适用于细胞治疗和基因组治疗^[1-4]。受损部位移植肌母细胞后, 细胞存活并呈肌样分化, 肌纤维可取代受损处形成的瘢痕组织^[5-6]。肌母细胞作为基因载体用于基因组治疗时, 可被病毒和非病毒载体转染, 从而可携带不同细胞因子和生长因子的基因来改善其生存、增殖和分化的能力^[7-10]。细胞培养在细胞培养的发展史中占有重要地位^[11-12], 体外细胞培养时血清具有重要作用, 是应用的最多、最广泛的培养基^[13-14], 但培养肌母细胞的胎牛血清中含有异源蛋白, 易引起人体变态反应^[15], 且因使用血清的批次不同, 细胞增殖状态差异较大, 异源血清的各种潜在危害, 使其生物安全性遭受质疑^[16-17]。由于动物血清存在缺陷, 一些研究人员使用人血清来代替胎牛血清, 促进细胞增殖并且保持细胞分化的潜能, 随着细胞扩增以及干细胞临床应用量的增大, 人血清来源成为难以解决的问题^[18], 故肌母细胞应用到临床, 迫切需要完善的无血清培养体系。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照培养基实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年3月至8月在武警总医院医学实验中心完成。

1.3 材料

肌母细胞培养实验用仪器与试剂:

试剂与仪器	来源
HyClone DMEM/F12 1:1 培养基	美国 Hyclone
UltraCULTURE™ 培养基	瑞士 Lonza
Gibco 培养基	美国 Thermo 公司
CO ₂ 培养箱	美国 Thermo
倒置显微镜	日本 Olympus
酶标仪	美国 Beckman
细胞计数仪	德国 Millipore

实验细胞: 采集成年烧伤志愿者股直肌手术后2 h内的肌肉组织2 g, 剪碎组织块除去脂肪后用胶原酶, 胰酶消化, 过滤收集肌母细胞, 接种到T25培养瓶, 于37 °C, 体积分数5%CO₂的培养箱中培养。差速贴壁纯化去除成纤维细胞和脂肪细胞, 胰酶消化传代, 一传二, 冻存, 随机选择第8代肌母细胞复苏备用。

1.4 实验方法

1.4.1 肌母细胞形态学观察 肌母细胞($1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)接种于12孔板, 每组4孔, 每孔1.5 mL培养于37 °C, 体积分数5%的CO₂培养箱, 倒置显微镜下每24 h观察一次细胞形态, 并描述记录。

1.4.2 肌母细胞纯度鉴定 肌母细胞($1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)接种于12孔板, 每组4孔, 每孔1.5 mL培养于37 °C, 体积分数5%的CO₂培养箱, 在细胞贴壁长满90%后, 用多聚甲醛A溶液固定, 30 min后滴加PBS冲洗; 每孔加入1 mL 0.5% triton x-100, 10 min, 增强细胞通透性, PBS冲洗; 加3% H₂O₂作用10 min; PBS冲洗后加体积分数10%牛血清作用20 min, 弃去牛血清, PBS冲洗; 加入Desmin抗体, 置于4 °C冰箱内, 过夜, 滴加PBS冲洗; 加入牛抗鼠IgG, 置于37 °C培养箱, 30 min后滴加PBS冲洗; 加入SABC试剂, 置于37 °C培养箱反应20 min后滴加PBS冲洗; 用新鲜配制DAB显色液作用, 光镜下控制显色程度。苏木精衬染, 再用PBS返蓝, 倒置显微镜下观察并计算阳性率, 实验重复3次。

1.4.3 肌母细胞增殖能力检测 梯度稀释配制单个细胞悬液, 每组6孔, 其中3孔加100个细胞, 3孔加300个细胞, 培养于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱, 6 d后换液, 形成克隆时终止培养, 多聚甲醛A固定, 染色, 计算克隆形成率, 实验重复3次。

1.4.4 肌母细胞生长状态监测 肌母细胞($1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)接种于12孔板, 每组1板, 分别于24, 48, 72, 96, 120, 144 h消化细胞计数, 绘制生长曲线示意图, 反映肌母细胞生长状态。

1.4.5 肌母细胞活性的测定 配制单细胞的悬液, 每孔加入200 μL, 密度为 10^4 个细胞, 一组10孔, 96孔板培养在37 °C, 体积分数5% CO₂培养箱, 2 d后加入MTT溶液20 μL

表1 肌母细胞在3种培养基的克隆形成率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)
 Table 1 Colony forming efficiency of human myoblasts cultured in three different media

培养基	克隆形成率
含胎牛血清培养基	0.298 3±0.008 7 ^{ab}
自制无血清培养基	0.183 3±0.011 5 ^a
间充质干细胞无血清培养基	0.083 3±0.005 0

表注: 与间充质干细胞无血清培养基组比较, ^a $P < 0.01$; 与自制无血清培养基组比较, ^b $P < 0.01$ 。

避光孵育, 4 h后终止培养, 去除上清, 每孔滴加200 μ L二甲亚砜, 振荡混匀10 min, 使得结晶充分溶解, 使用酶标仪测定在490 nm处的吸光度(A值), 计算细胞存活率, 实验重复3次。

1.4.6 干预 实验分为3组: ①含胎牛血清培养基组DMEM/F12 1:1添加胰岛素样生长因子1, 碱性成纤维细胞生长因子, 体积分数20%胎牛血清。②间充质干细胞无血清培养基组, 培养体系为: 无血清培养基、2%血清替代物、2 mmol/L L-谷氨酰胺, 分离培养的贴壁细胞为人脐带间充质干细胞, 参考文献[19]的方法培养鉴定, 细胞纯度大于99%, UltraCULTURE™添加血清替代物, 谷氨酰胺。③自制无血清培养基组Gibco™添加胰岛素样生长因子1, 碱性成纤维细胞生长因子, 谷氨酰胺。

1.5 主要观察指标 不同培养基培养肌母细胞在形态、纯度、增殖能力、生长状态、活性上产生的差异。

1.6 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析进行统计学处理, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 肌母细胞形态学分析 倒置显微镜下观察, 肌母细胞尚未着壁为圆形小细胞, 胞浆透亮。24 h后, 大部分肌母细胞着壁。2 d后肌母细胞成为单核梭形细胞, 胞核呈卵圆形, 胞质致密。长满90%时, 整体肌母细胞呈漩涡状走行, 见图1。

2.2 肌母细胞阳性率 Desmin染色后光镜下观察细胞呈棕色, 苏木精-伊红复染胞核为蓝色, 计算肌母细胞阳性率均达到99%, 见图2。

2.3 肌母细胞克隆形成率 大于10个细胞计为一个克隆, 倒置显微镜下观察克隆形成数, 除以接种浓度计算克隆形成率, 进行统计分析结果为含胎牛血清培养基组和自制无血清培养基组显著高于间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$), 含胎牛血清培养基组显著高于自制无血清培养基组($P < 0.01$) 见表1, 见图3。

2.4 肌母细胞生长曲线 每24 h消化计数, 基数为 10^5 , 绘制细胞生长曲线, 72 h时细胞增殖基本达到最高峰, 含胎牛血清培养基组与自制无血清培养基组细胞数远高于间充质干细胞无血清培养基组, 自制无血清培养基组对数期增殖能力稍低于含胎牛血清培养基组, 但稳定期细胞数基本一致, 见图4。

表2 肌母细胞在3种培养基的活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, A)
 Table 2 Viability of human myoblasts cultured in three different media

培养基	活性
含胎牛血清培养基	0.207±0.017 ^a
自制无血清培养基	0.402±0.022
间充质干细胞无血清培养基	0.202±0.029 ^a

表注: 自制无血清培养基组比较, ^a $P < 0.0$ 。

2.5 肌母细胞活性 酶标仪检测490 nm吸光度值, 反映活细胞量, 统计分析结果显示自制无血清培养基组显著高于含胎牛血清培养基组和间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$), 含胎牛血清培养基组与间充质干细胞无血清培养基组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

2.6 可能影响结果的因素 主观因素误差。

3 讨论 Discussion

近年, 细胞移植重塑坏死区的心肌结构的方法受到广泛关注^[20-21]。临床上报道自体肌肉提取的细胞用于治疗人体缺血性心脏病和尿失禁, 证明了疗效取决于注射细胞的数量, 当肌母细胞 $>1 \times 10^8$ 时得到明显的结果或症状的改善^[22-23]。扩增自体肌母细胞可用于多种疾病的治疗^[24], 且肌母细胞不会癌变, 可以纯化、大量培养, 故其在临床中有广泛的应用前景。本实验对3种培养基进行比较研究, 旨在筛选与含胎牛血清培养基培养基作用相近的无血清培养基。

由图1可知: 含胎牛血清培养基组、自制无血清培养基组和间充质干细胞无血清培养基组形态上无较大差异, 说明各组培养基体外均可以培养出肌母细胞, 单个视野范围内, 自制无血清培养基组贴壁较含胎牛血清培养基组晚, 成分中可添加重组蛋白增加其黏附作用^[25-26], 间充质干细胞无血清培养基组早期凋亡悬浮细胞碎片较多。

有研究表明Desmin蛋白在肌母细胞中特异性表达^[27], 本实验免疫组织化学结果显示含胎牛血清培养基组、自制无血清培养基组和间充质干细胞无血清培养基组阳性率均达99%, 说明3种培养基培养的肌母细胞均纯度较高。

肌母细胞增殖能力检测得出含胎牛血清培养基组和自制无血清培养基组克隆形成率显著高于间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$), 含胎牛血清培养基组克隆形成率显著高于自制无血清培养基组($P < 0.01$), 显然自制无血清培养基组在增殖能力上优于间充质干细胞无血清培养基组, 低于含胎牛血清培养基组, 自制无血清培养基组在促进细胞分裂增殖方面需要优化。

观察生长曲线, 72 h时细胞增殖基本达到最高峰, 含胎牛血清培养基组与自制无血清培养基组细胞数远高于间充质干细胞无血清培养基组, 自制无血清培养基组对数期增殖能力稍低于含胎牛血清培养基组, 但稳定期细胞数基本一致。

MTT实验显示, 自制无血清培养基组细胞活性显著高于

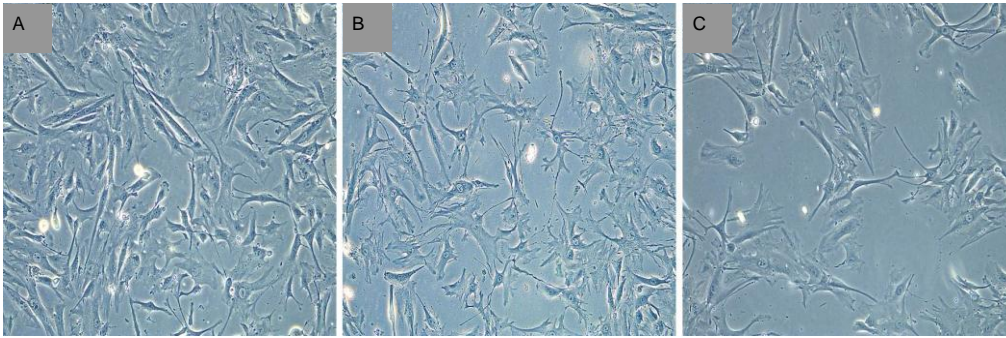


图1 肌母细胞在3种培养基的形态(x10)
Figure 1 Morphology of human myoblasts cultured in three different media (x10)
图注: A 图为含胎牛血清培养基组; B 图为自制无血清培养基组; C 图为间充质干细胞无血清培养基组。

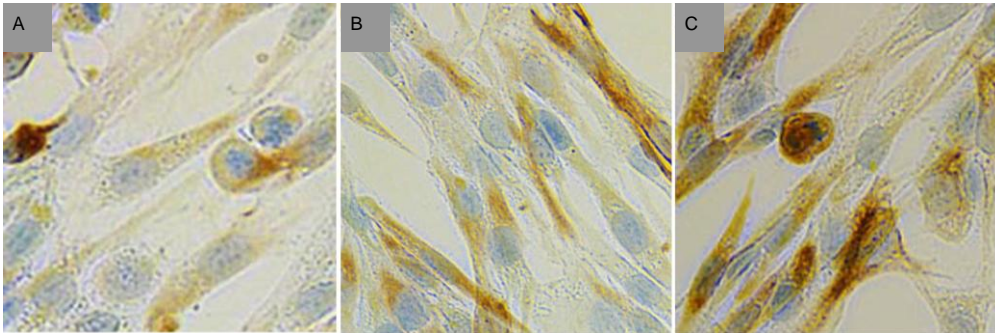


图2 肌母细胞在3种培养基的免疫组织化学结果(x20)
Figure 2 Immunohistochemical detection of human myoblasts cultured in three different media (x20)
图注: A 图为含胎牛血清培养基组; B 图为自制无血清培养基组; C 图为间充质干细胞无血清培养基组。

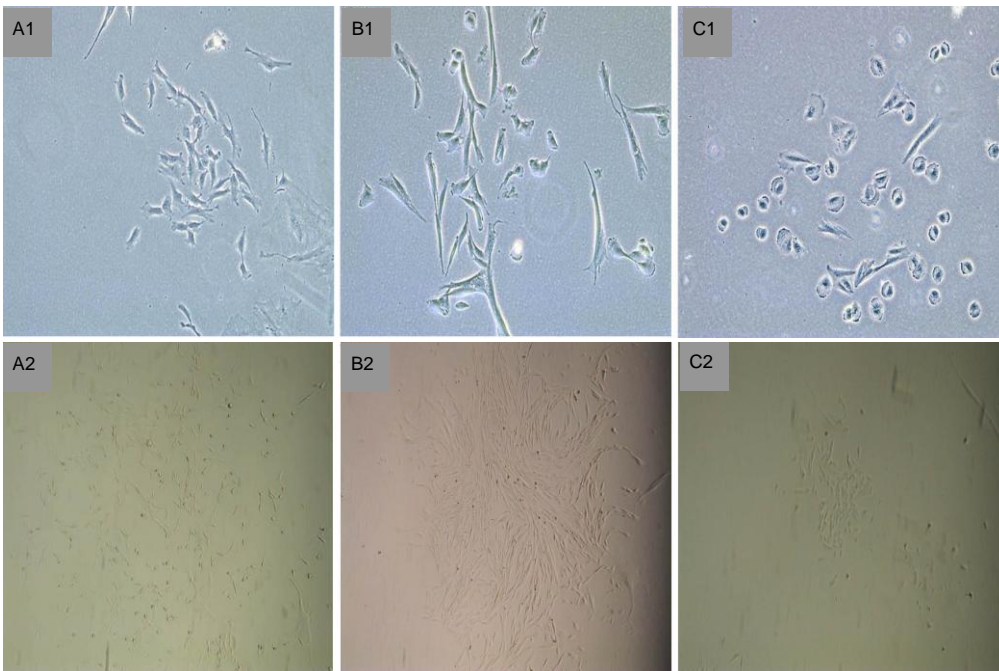


图3 肌母细胞在3种培养基的克隆形成状态(A1, B1, C1: x10; A2, B2, C2: x4)
Figure 3 Clone formation of human myoblasts cultured in three different media (A1, B1, C1: x10; A2, B2, C2: x4)
图注: A 图为含胎牛血清培养基组; B 图为自制无血清培养基组; C 图为间充质干细胞无血清培养基组。

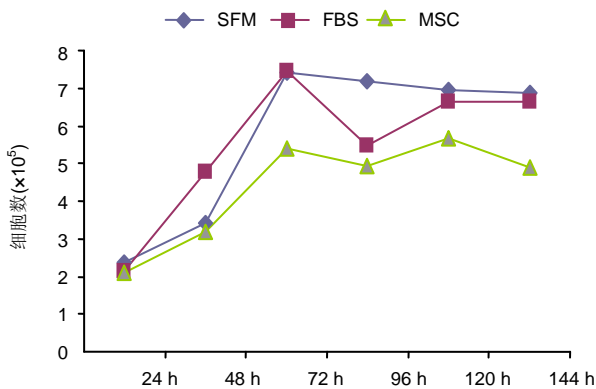


图4 肌母细胞在3种培养基的生长曲线
Figure 4 Growth curves of human myoblasts cultured in three different media
图注: SFM: 自制无血清培养基; FBS: 含胎牛血清培养基; MSC: 间充质干细胞无血清培养基。自制无血清培养基组对数期增殖能力稍低于含胎牛血清培养基组, 但稳定期细胞数基本一致。

含胎牛血清培养基组和间充质干细胞无血清培养基组($P < 0.01$), 含胎牛血清培养基组细胞活性与间充质干细胞无血清培养基组无明显差异($P > 0.05$), 活细胞的多少反映了细胞生长的活性和状态^[28], 而且可能影响产品的质量。

综上, 自制无血清培养基培养出的肌母细胞在形态、活性、生长状态上优于含胎牛血清培养基培养的细胞, 可大量扩增用于临床移植; 但在细胞增殖能力方面弱于含胎牛血清培养基, 因此在促进肌母细胞早期贴壁、增殖上还需进一步优化。

致谢: 感谢刘谋元老师, 周立冬老师, 刘理金同学对本实验研究的帮助。

作者贡献: 王琳负责课题的制定、实施及文章的撰写; 刘谋元负责课题的实施; 周立冬负责文章的撰写; 刘爱兵负责课题的制定。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 肌纤维母细胞? 肌纤维母细胞是结缔组织的主要细胞类型之一, 它广泛分布于软组织以及几乎所有器官中, 但起源于肌纤维母细胞的肿瘤是否存在一直被广泛争论。随着病理学以及电镜技术的进展, 肌纤维母细胞源性肿瘤的存在才被逐渐接受。然而, 肌纤维母细胞源性的肿瘤并不多见, 且多为良性, 恶性者极为少见, 所以至今为止, 人们对恶性肌纤维母细胞肉瘤的认识并不透彻。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Peter K Law, Danlin M Law. Human myoblast genome therapy. *J Geriatr Cardiol.*2006;3(3):135-149.
- [2] Hecht N, Marushima A. Myoblast-mediated gene therapy improves functional collateralization in chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke.*2015;46(1):203-211.
- [3] 刘立斌, 周红雨. 成肌细胞的临床应用现状及前景[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(7):767-770.
- [4] 张慧, 李巧云. 肌母细胞对裸鼠子宫内内膜癌的初步治疗研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(17):2868-2871.
- [5] Reinecke H, Murry CE. Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing. *Cardiovas Pathol.*2000; 9(6): 337-344.
- [6] 柳太云, 代宏. 成肌性标志物在人骨髓间充质干细胞分化为肌细胞过程中的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(5):516-520.
- [7] Suzuki K, Murtuza B. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation.* 2001;104 (12Suppl 1): 207-212.
- [8] Murtuza B, Suzuki K. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2004; 101(12): 4216-4221.
- [9] Elmadbouh I, Haider HK. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1alpha promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.*2007;42(4): 792-803.
- [10] Aharinejad S, Abraham D. Colony-stimulating factor-1 transfection of myoblasts improves the repair of failing myocardium following autologous myoblast transplantation. *Cardiovasc Res.*2008;79(3): 395-404.
- [11] 黄锭, 黎文明. Plackett-Burman 与响应面法相结合优化化学成分明确的 MDCK 细胞无血清无蛋白培养基[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(6):835-842.
- [12] Tsugeno Y, Sato F. Cell culture of human gingival fibroblasts, oral cancer cells and mesothelioma cells with serum free media, STK1 and STK2. *Biomed Rep.*2014;2(5):644-648.
- [13] 段盼盼, 杨帆. Vero 细胞无血清培养基的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5):518-522.
- [14] 郭纪元, 夏宁邵. CHO DG44 稳定细胞株无血清培养基的研发与优化[D]. 厦门大学, 2014.
- [15] Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to the rapetic applications different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera. *Int J Dev Biol.*2008;52(8):1023-1035.
- [16] 陈林, 张坤. 脐带间充质干细胞无血清和含胎牛血清培养基培养体系比较[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2014, 28(9):57-61.
- [17] Mizuno N, Shiba H. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell Biol Int.*2006;30 (6):521-524.
- [18] 于欢, 谷翔. S1P 对缺氧/复氧诱导的共培养心肌细胞和成肌细胞损伤的影响[J]. 华中科技大学学报, 2013, 42(6):637-641.
- [19] 王黎明, 刘爱兵. 脐带间充质干细胞的分泌蛋白表达谱研究[D]. 安徽医科大学, 2014.
- [20] Dubey L, Sharma M. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction-a review. *Acta Cardiol.*2011;66(6):691-699.
- [21] Peters K, Kaufman M. 1340 Autologous muscle derived cell therapy for the treatment of female stress urinary incontinence: A multi-center experience. *Urol.*2011;185: 535-536.
- [22] Baj A, Bettaccini AA. Culture of skeletal myoblasts from human donors aged over 40 years: dynamics of cell growth and expression of differentiation markers. *Transl Med.*2005;12: 1-10.
- [23] Jarocha D, Stangel-Wojcikiewicz K, Basta A, et al. Efficient myoblast expansion for regenerative medicine use. *Int J Mol Med.* 2014;34(1):83-91.
- [24] 万居易, 李温斌. 骨骼肌肌母细胞修复心肌的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(2):186-191.
- [25] Taub M. The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxicology in vitro.*1990;4(3):213-225.
- [26] 宗超, 黄磊. 无血清培养基中蛋白类补充因子重组生产研究进展[J]. 药物生物技术, 2014, 21(2):162-165.
- [27] 方晗, 余龙江. 肌母细胞分离纯化及 frg 转基因细胞株构建[D]. 华中科技大学, 2013.
- [28] 秦瑞峰, 顾晓明. 小鼠骨骼肌细胞体外培养的增殖及分化关系[J]. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(9):535-536.