

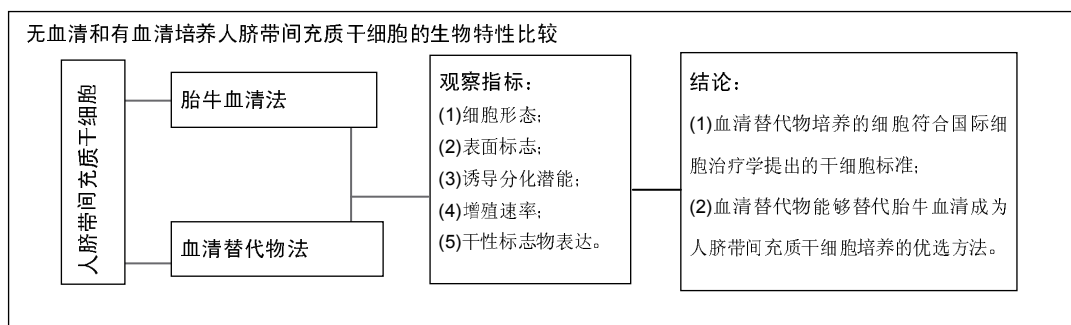
无血清和有血清培养人脐带间充质干细胞的对比

张学娟^{1,2}, 刘高米洋², 刘菊芬², 宋乙甲^{1,2}, 林庆铿^{1,2}, 白盈盈^{1,2}, 潘兴华² (¹昆明医科大学解放军昆明总医院临床学院, 云南省昆明市 650032; ²解放军昆明总医院细胞生物治疗中心, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 云南省昆明市 650032)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0496

ORCID: 0000-0003-2572-725X(张学娟)

文章快速阅读:



张学娟, 女, 1993 年生, 云南省大理州人, 白族, 昆明医科大学在读硕士, 主要从事人脐带间充质干细胞与衰老相关研究。

并列第一作者: 刘高米洋, 女, 1988 年生, 云南省宣威市人, 汉族, 2014 年海军军医大学(原第二军医大学)毕业, 硕士, 医师, 主要从事脐带间充质干细胞的临床转化研究。

文题释义:

胎牛血清: 含有细胞生长所需的基本营养成分和丰富的生物活性因子(如生长因子、激素、多肽类物质等), 在细胞的代谢、增殖与分化中发挥着重要的调节作用, 用于临床规模生产间充质干细胞的大多数分离和扩增方案均使用补充有体积分数为 10% 胎牛血清的培养基。

血清替代物: 不含异种血清, 但包含细胞生长所需的营养素、细胞因子, 可避免免疫排斥、病毒传播等问题, 用血清替代物培养的细胞上清可直接用来提取外泌体, 排除血清的影响。

摘要

背景: 研究表明有血清培养体系存在若干风险和问题, 比如免疫排斥、批次差异、病毒风险等, 另外随着外泌体的发现和应用, 无血清培养体系变得越来越重要。

目的: 系统比较人脐带间充质干细胞无血清培养体系与传统有血清培养体系的异同, 为人脐带间充质干细胞的临床转化奠定基础并提供实验数据。

方法: 无菌条件下采集健康剖宫产足月儿脐带, 组织块贴壁法培养人脐带间充质干细胞, 从第 1 代开始有血清培养组用体积分数为 10% 胎牛血清培养, 血清替代物组用体积分数为 15% 血清替代物培养。倒置显微镜观察其形态变化, 流式细胞仪检测其表面标记物, CCK-8 检测其增殖能力, 诱导分化实验检测其多向分化潜能, Western Blot 检测干性标志物 oct4、nanog、sox2 的蛋白水平。

结果与结论: ①倒置显微镜下观察可见血清替代物组人脐带间充质干细胞呈现较均一的漩涡状生长, 胎牛血清组人脐带间充质干细胞随着细胞代数的增加逐渐出现细胞分化或者老化现象; ②两种培养法培养的人脐带间充质干细胞均表达 CD73、CD90 和 CD105, 低表达 CD34 和 CD45, 二者无明显差异; ③增殖能力上胎牛血清组优于血清替代物组; ④两种培养法培养的人脐带间充质干细胞均具有成脂、成骨、成软骨诱导分化能力, 二者无明显差异; ⑤血清替代物组与胎牛血清组 oct4、nanog 的表达水平无显著差异, 血清替代物组 sox2 表达水平高于胎牛血清组 ($P < 0.05$); ⑥血清替代物培养的人脐带间充质干细胞符合间充质干细胞国际标准, 血清替代物能够替代胎牛血清成为培养人脐带间充质干细胞的优选方法。

关键词:

脐带间充质干细胞; 胎牛血清; 血清替代物; 外泌体; 干细胞

主题词:

脐带; 间充质干细胞; 血清; 组织工程

基金资助:

云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室(2015DG034); 全军实验动物专项(SYDW(2016)004)

A comparative study on serum-free and serum culture methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Zhang Xue-juan^{1,2}, Liu Gao-mi-yang², Liu Ju-fen², Song Yi-jia^{1,2}, Lin Qing-keng^{1,2}, Bai Ying-ying^{1,2}, Pan Xing-hua² (¹Kunming General Hospital Clinical College of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China)

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-02

Zhang Xue-juan, Master candidate, Kunming General Hospital Clinical College of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China; Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Liu Gao-mi-yang, Master, Physician, Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Zhang Xue-juan and Liu Gao-mi-yang contributed equally to this work.

Corresponding author:

Pan Xing-hua, M.D., Chief physician, Professor, Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown increasing risks and problems in the serum culture system, such as immune rejection, batch differences and virus risk. In addition, with the discovery and application of exosomes, the serum-free culture system is becoming an increasing concern.

OBJECTIVE: To compare the similarities and differences between the serum-free culture system and the traditional serum culture system, which lays the foundation for the clinical transformation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) and provides experimental data.

METHODS: Umbilical cord was collected from term infants of cesarean section under aseptic condition, and hUCMSCs were isolated and cultured by explant tissue technique. hUCMSCs was cultured with 10% fetal bovine serum (FBS) and 15% serum substitutes (AGS) from the original generation. Then an inverted microscope was used to observe cell morphological changes. Flow cytometry was used to detect cell surface markers. Cell counting kit-8 was used to detect cell proliferation. Induced differentiation experiment was used to detect cell differentiation potential. Western Blot was used to detect the protein levels of oct4, nanog and sox2.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the inverted microscope, hUCMSCs cultured with AGS showed more uniform vortex-like growth, and those cultured with FBS gradually appeared with cell differentiation or aging with the increase of cell generations. hUCMSCs cultured by both methods expressed CD73, CD90 and CD105 but lowly expressed CD34 and CD45, and there was no significant difference between the two culture methods. FBS method was superior to AGS method in proliferation ability. Results from the induced differentiation experiments showed that hUCMSCs cultured by both methods had adipogenic, osteogenic and chondrogenic abilities, and there was no significant difference between the two culture methods. hUCMSC cultured by both methods expressed oct4 and nanog but showed no significant difference in level, while the expression of sox2 was significantly higher in the hUCMSCs cultured by AGS than by FBS ($P < 0.05$). To conclude, the hUCMSCs cultured with AGS are in accordance with the international standards of mesenchymal stem cells. The AGS method as an alternative to the FBS method can become a preferred method for hUCMSCs culture.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Serum; Tissue Engineering

Funding: the Project of the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, No. 2015DG034; the Experimental Animal Specific Fund of PLA, No. SYDW(2016)004

0 引言 Introduction

研究表明,间充质干细胞除了存在于骨髓中,还存在于人体的其他组织中,如脂肪、脐血、脐带、胎盘绒毛、牙龈和牙周膜等^[1-5]。其中,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)因来源广、取材方便、免疫原性低、短期内可大量扩增、对孕妇胎儿无痛苦且不受伦理学争议等众多优势成为干细胞治疗中的主力军。

大量的研究证明间充质干细胞在再生医学中具有巨大潜力,在临床上可被用于治疗各种疾病,如难治性系统性红斑狼疮肾炎^[6-10]、心肌梗死^[11]、2型糖尿病^[12]、脊髓损伤^[13]、脑外伤后遗症^[14]、脑卒中^[15]、自闭症等^[16]。因此,获得安全可靠、质量稳定的人脐带间充质干细胞是临床应用的前提。目前,国内外培养人脐带间充质干细胞基本采用含体积分数为10%胎牛血清的基础培养基DMEM/F12^[17-19]。但有血清培养法无论如何改进,仍然存在一定的不足,主要包括:①动物血清作为异种血清,存在免疫排斥;②动物血清可能含有致病因子和外源毒物,如病毒和朊病毒的传播,并不能保证百分之百安全;③血清不同批次间存在质量差异^[20-24];④血清中含有大量外泌体,不能用于人脐带间充质干细胞外泌体的分离和提纯。这些都会成为人脐带间充质干细胞临床转化的障碍,因此无血清培养体系的建立成为人脐带间充质干细胞及其外泌体进行临床转化的重要前提。

很多研究中都提出了无血清培养法,并且无血清培养法以越来越明显的优势成为很多细胞培养的主要方式。无

血清培养基成分明确稳定,制备简单,可以弥补有血清培养法的缺陷。基于此,实验对比研究了有血清培养法和无血清培养法培养的人脐带间充质干细胞形态、表面抗原、诱导分化能力、增殖速率以及干性标志物是否有差异。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学对比观察实验。

1.2 时间及地点 于2017年8至10月在解放军昆明总医院细胞生物治疗中心完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带 征得产妇同意,家属签署知情同意书,于解放军昆明总医院妇产科产房采集健康剖宫产足月儿脐带。产妇无传染性疾病、遗传病史,胎儿无先天性疾病。实验经医院伦理会批准。

1.3.2 实验试剂和设备 DMEM/F12培养基(美国BI公司);胎牛血清(美国Gibco公司);血清替代物(美国Stembo公司,货号: C08004); 0.25% trypsin-EDTA(美国BI公司);流式抗体CD73、CD90、CD105、CD34、CD45(美国BD公司);间充质干细胞成脂、成骨、成软骨诱导分化培养基(赛业(广州)生物科技有限公司);抗体oct4、nanog、sox2(美国BD公司);CCK-8试剂盒(碧云天生物科技有限公司);倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司);SW-CL-2F型百万层级流超净工作台(苏州佳宝公司);二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);酶标仪(美国Rayto公司);FACS caliber流式细胞仪(美国BD公司);Tanon 5200 Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的分离及培养 无菌条件下, 含青链霉素混合液的生理盐水清洗脐带2次至无残余血液, 剥离脐带动静脉保留外膜。将脐带剪成2 mm×2 mm组织块, 再剪碎至无明显组织块, 加入含体积分数为15%胎牛血清、体积分数为7.5%胎牛血清+体积分数为7.5%血清替代物和体积分数为15%血清替代物的DMEM/F12中, 放置37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。于接种第2天补液, 以后每隔3 d换液1次。在倒置显微镜下观察细胞的形态和生长情况。待贴壁细胞融合至80%–90%时, 用0.25% trypsin-EDTA消化传代, 从第1代开始有血清培养法用体积分数为10%胎牛血清培养, 血清替代物法用体积分数为15%血清替代物培养。

1.4.2 人脐带间充质干细胞的免疫表型检测 收集第3代细胞, 用PBS重悬, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 加入抗体CD90-FITC、CD105-PerCP-Cy-5-5A、CD73-APC、CD34-PE、CD45-FITC以及同型对照PE-Isotype Control Negative Cocktail 4℃避光孵育30 min, 用PBS代替一抗作空白对照, 通过流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

1.4.3 人脐带间充质干细胞体外分化潜能检测

成脂诱导: 收集第5代细胞, 按 1×10^4 个/cm²接种到12孔板, 37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中静置培养, 至细胞长至60%时, 吸弃原培养液, 加入成脂诱导分化液(阴性对照未加成脂诱导分化液), 每隔3 d换液1次。培养14 d后, 40 g/L多聚甲醛固定后进行油红O染色观察, 显微镜(×100)下随机选取3个视野计数总细胞数和染色阳性的细胞数, 阳性率(%)=染色阳性的细胞数/总细胞数×100%, 以下成骨、成软骨阳性细胞以同样方法计数。

成骨诱导: 收集第5代细胞, 按 2×10^4 个/cm²接种到12孔板, 37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中静置培养, 至细胞长至80%时, 吸弃原培养液, 加入成骨诱导分化液(阴性对照未加成骨诱导分化液), 每隔3 d换液1次。培养21 d后, 40 g/L多聚甲醛固定后进行茜素红染色观察。

成软骨诱导: 收集第5代细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 各取5 μL接种到12孔板中, 37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中静置培养, 2 h后加入预热的成软骨诱导分化液(阴性对照未加成软骨诱导分化液), 每隔3 d换液1次。培养14 d后, 40 g/L多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片, 阿新蓝染色观察。

1.4.4 人脐带间充质干细胞的增殖速率检测 消化收集第5代细胞, 分别用体积分数为10%胎牛血清、10%血清替代物、15%血清替代物和20%血清替代物重悬并细胞计数, 每种体积分数3个复孔, 按 3×10^3 个/孔接种到96孔板中, 200 μL/孔, 每天吸弃原培养液, 加入DMEM/F12与CCK-8试剂10:1混合液, 200 μL/孔, 37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中孵育1 h后用酶标仪(490 nm)检测各孔吸光度值, 连续检测6 d, 以时间为横轴, 吸光度值为纵轴绘制生长曲线, 重复3次。

1.4.5 Western Blot法检测人脐带间充质干细胞oct4、nanog和sox2蛋白表达 收集长至90%–100%的第5代细胞, 提取细胞蛋白, 测定蛋白浓度, 将收集的蛋白与蛋白上样缓冲液3:1混合, 100℃沸水浴10 min使蛋白变性, 冰上冷却10 min后进行电泳, 用PVDF膜转膜, 转膜后用5%脱脂奶粉封闭, 加入一抗孵育过夜, 内参为GAPDH, 1×TBST 10 min洗涤3次后加入二抗孵育1 h, 再次洗涤, 加入BeyoECL Plus A、B混合液染色1 min, 采用Tanon软件扫描和分析蛋白条带。

1.5 主要观察指标 人脐带间充质干细胞的形态、表面抗原、增殖能力、分化能力和相关蛋白水平。

1.6 统计学分析 研究数值均用Graph Pad 6.0软件处理, 各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞的分离及培养结果 采用组织块贴壁法分离培养人脐带间充质干细胞, 原代培养10 d后, 血清替代物法形态更均一(图1); 随着继续传代培养, 血清替代物组细胞呈现较均一的涡漩状生长, 而传统胎牛血清组则随着细胞代数的增加逐渐出现细胞分化或者老化现象(图2)。

2.2 人脐带间充质干细胞的表面抗原表达 流式细胞仪检测血清替代物组人脐带间充质干细胞表面抗原CD73、CD90和CD105阳性率为100%、99.5%和98.8%, CD34和CD45阳性率为11.6%和0.079%, 胎牛血清组人脐带间充质干细胞表面抗原CD73、CD90和CD105阳性率为99.9%、97.9%和93.5%, CD34和CD45阳性率为2.22%和0.209%(图3), 符合人脐带间充质干细胞的表型特征, 两种方法培养的人脐带间充质干细胞表面抗原无明显差异。

2.3 人脐带间充质干细胞的诱导分化能力 用第5代人脐带间充质干细胞进行体外诱导分化实验(图4), 诱导分化实验用时达14–21 d, 阴性对照组细胞100%融合后继续培养细胞逐渐死亡, 因此阴性对照的图片未列出。成骨诱导后经茜素红染色, 出现红染的钙结节, 胎牛血清组和血清替代物组的阳性率分别为90%和80%。成软骨诱导后经阿新蓝染色, 出现蓝染的软骨细胞合成的蛋白多糖, 胎牛血清组和血清替代物组的阳性率均为90%。成脂诱导后经油红O染色, 出现红染的脂滴, 胎牛血清组和血清替代物组的阳性率分别为90%和80%。两种培养法无显著差异。

2.4 人脐带间充质干细胞的增殖能力 将人脐带间充质干细胞接种于96孔板, 条件培养基分别为体积分数为10%胎牛血清、10%血清替代物、15%血清替代物和20%血清替代物, 连续培养6 d, 绘制生长曲线, 见图5。第1–3天体积分数为10%胎牛血清组增殖速率明显高于3个血清替代物组($P < 0.05$), 第4天后增殖速率无明显差异($P > 0.05$), 血清替代物组随着体积分数增高, 增殖速率加快。

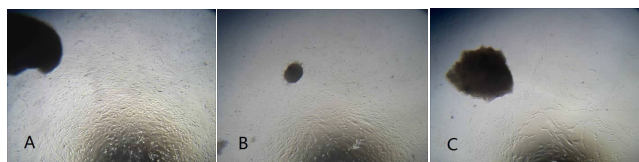


图 1 倒置显微镜观察原代人脐带间充质干细胞的形态($\times 40$)

Figure 1 The morphology of primary human umbilical cord mesenchymal stem cells under inverted microscope ($\times 40$)

图注: 图中 A 为体积分数为 15% 胎牛血清组原代培养 10 d 后组织块周围爬出梭形细胞, 同时混杂较多杂细胞, 形态不均一, 但细胞数目较多; B 为体积分数为 7.5% 胎牛血清+体积分数为 7.5% 血清替代物混合组原代培养 10 d 后组织块周围爬出梭形细胞, 有较多杂细胞, 但细胞排列较体积分数为 15% 胎牛血清组整齐; C 为体积分数为 15% 血清替代物组原代培养 10 d 后组织块周围爬出长梭形细胞, 细胞数目较前两者较少, 但形态均一, 杂细胞相对较少。

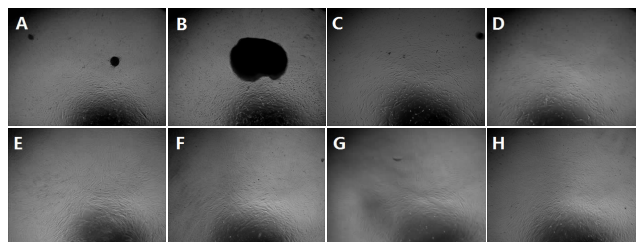


图 2 倒置显微镜下观察各代人脐带间充质干细胞的形态($\times 40$)

Figure 2 The morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells of different passages under inverted microscope ($\times 40$)

图注: 图中 A, C, E, G 为血清替代物组(含体积分数为 15% 血清替代物)原代、第 1 代、第 3 代、第 5 代人脐带间充质干细胞; B, D, F, H 为胎牛血清组(含体积分数为 10% 胎牛血清)原代、第 1 代、第 3 代、第 5 代人脐带间充质干细胞。

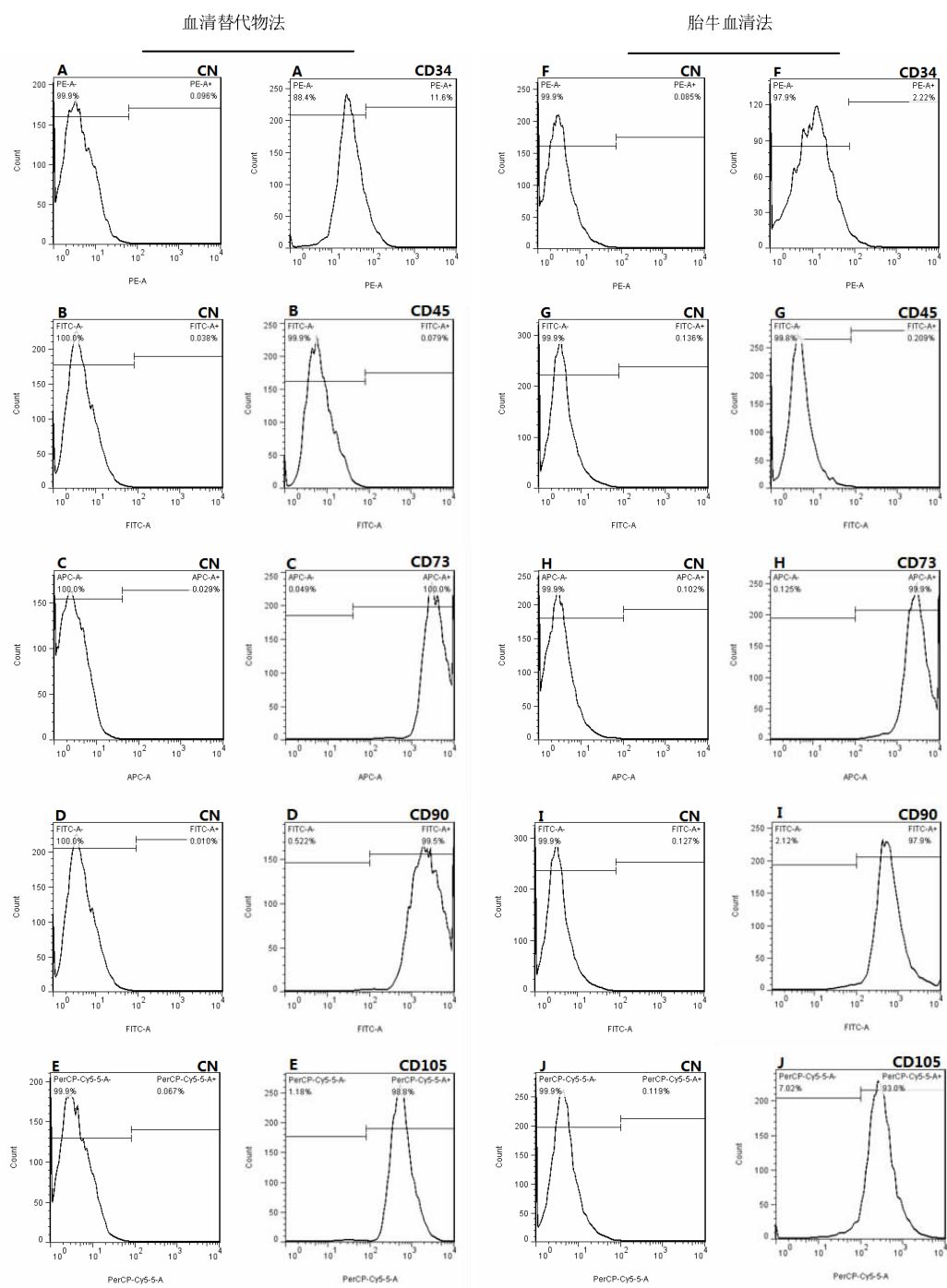


图 3 流式细胞术分析人脐带间充质干细胞的表面抗原表达

Figure 3 Surface antigen expression of human umbilical cord mesenchymal stem cells detected by flow cytometry

图注: 图中 A-E 为血清替代物组; F-J 为胎牛血清组。两组人脐带间充质干细胞表面抗原 CD73、CD90 和 CD105 呈阳性表达, CD34 和 CD45 呈阴性表达。

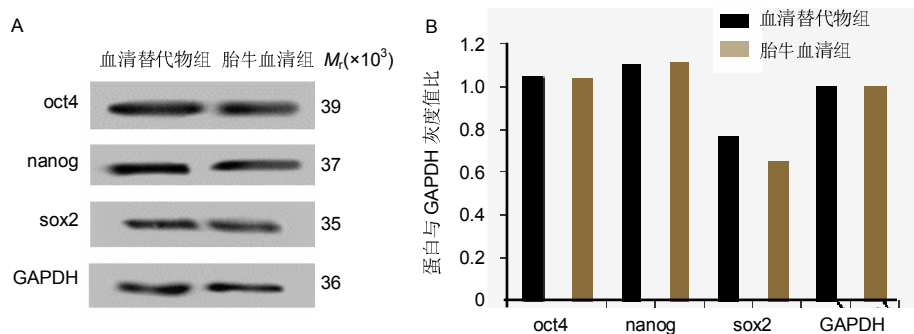


图6 Western blot 检测 oct4、nanog 及 sox2 在人脐带间充质干细胞内的表达
Figure 6 Expression of oct4, nanog and sox2 of human umbilical cord mesenchymal stem cells detected by Western blot assay

图注: 图中 A 为蛋白条带; B 为蛋白条带灰度值与内参灰度值的比值, 血清替代物组与胎牛血清组 oct4、nanog 的表达水平无显著差别, 血清替代物组 sox2 表达水平高于胎牛血清组。

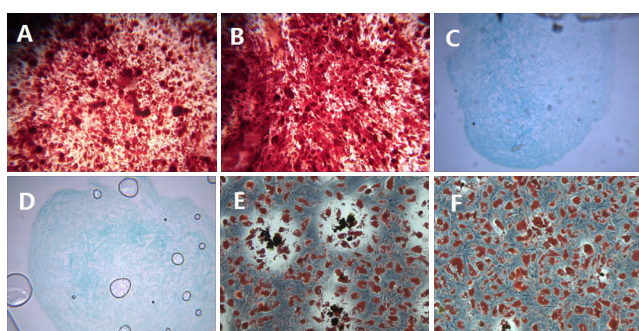


图4 第5代人脐带间充质干细胞成骨、成软骨和成脂诱导分化能力(×100)

Figure 4 Osteogenic, chondrogenesis and adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells at passage 5 (×100)

图注: 图中 A, B 为血清替代物组、胎牛血清组人脐带间充质干细胞成骨诱导分化后茜素红染色; C, D 为血清替代物组、胎牛血清组人脐带间充质干细胞成软骨诱导分化后阿新蓝染色; E, F 为血清替代物组、胎牛血清组人脐带间充质干细胞成脂诱导分化后油红 O 染色。

2.5 人脐带间充质干细胞oct4、nanog及sox2蛋白的表达
Western blot实验结果显示, 血清替代物组与胎牛血清组 oct4、nanog 的表达水平无显著差异, 血清替代物组 sox2 表达水平高于胎牛血清组($P < 0.05$), 见图6。

3 讨论 Discussion

为了保证间充质干细胞临床应用的安全性和其他问题, 细胞培养基由开始添加胎牛血清, 到后来寻找胎牛血清替代物的过程, 血清替代物需为细胞提供营养素、细胞因子, 特别是生长因子, 这些替代品包括自体或异体人血清、人血浆^[25]、脐血血清^[26-29]、人血小板衍生物(包括血小板裂解物和血小板释放的因子^[30])。

Kocaoemer等^[25]研究结果显示混合AB血型的人血清和凝血酶活化的血小板血浆培养的脂肪间充质干细胞免疫表型和分化能力与胎牛血清培养无明显差异, 增殖速率甚至远远超过胎牛血清培养的细胞。Mohammadi等^[31]则用血小板裂解物替代胎牛血清培养人脐带间充质干细胞, 得到的人脐带间充质干细胞具有典型的形态、免疫表型和分化能力, 而且通过核型分析表明对染色体没有任何影响。Bieback等^[32]研究结果首次显示与培养基中补充胎牛血清、

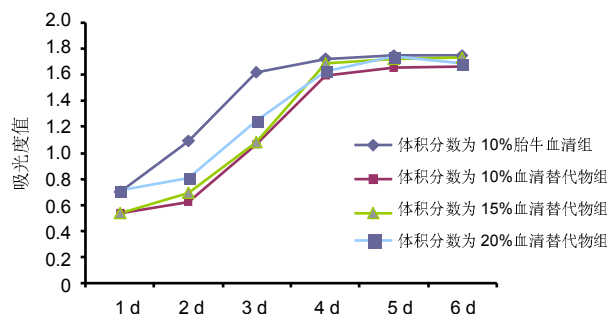


图5 人脐带间充质干细胞的生长增殖能力

Figure 5 Growth and proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 血清替代物组人脐带间充质干细胞生长速率与胎牛血清组相比略低, 前3d 差异有显著性意义。

人血清或凝血酶活化的血小板血浆相比, 用添加人血小板裂解物培养的骨髓间充质干细胞群体倍增和扩增动力学显著增强, 人血清或凝血酶活化的血小板血浆培养最少要3代才能获得临床所需细胞产量, 而人血小板裂解物第1至2代就能获得, 同时也没有发现人血小板裂解物批次间变异性, 这与胎牛血清形成了鲜明的对比。

大量的研究都证明用很多物质能代替胎牛血清, 保持间充质干细胞的免疫表型、分化和免疫调节能力的同时又能快速且长期扩增。其中这些物质中起主要作用是转化生长因子 β 、血小板衍生生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, Ng等^[33]研究表明这3种因子的组合足以在无血清培养基中培养扩增间充质干细胞, 且保持免疫表型和分化能力。当然, 根据培养的细胞不同, 除基础培养基外添加的成分及含量会有变化。目前无血清培养法除了应用于间充质干细胞, 还应用于肿瘤细胞如乳腺癌细胞系^[34], 以及疫苗生产等^[35]。

无血清培养法的应用还有一方面是因为外泌体的兴起。外泌体是一种直径在50-100 nm里面包含蛋白质和RNA的囊泡, 可以穿过细胞膜, 具有生物活性且携带信号^[36-38]。一些研究发现使用脐带间充质干细胞作为治疗药物时, 当治疗已经终止, 其生物学效能尚未减弱, 并且可能随着时间的推移被放大^[39]。还有一些研究发现移植细胞输入体内后实际到达靶组织的比例 $< 1\%$, 大部分细胞被困在肝脏、脾脏和肺部^[40]。随着旁分泌假说的出现, 外泌体的治疗应用前景更为广阔。据报道, 外泌体具有与间充质干细胞相似

的功能, 并认为间充质干细胞其实是通过它本身分泌的外泌体发挥作用且得到了证实^[41-45]。以往的研究中并没有比较无血清培养法和传统有血清培养法哪一种得到的外泌体更好。本实验室培养人脐带间充质干细胞方法较为成熟, 综合各方面考虑胎牛血清的适合体积分数为10%, 血清替代物的适合体积分数为15%, 因此主要比较体积分数为10%胎牛血清和体积分数为15%血清替代物培养结果的差异。

无血清培养基是一种不添加血清就能维持细胞在体外生长的合成培养基。本实验采用的无血清培养基是 StemBo™ Advanced Growth Supplement, 无动物来源, 无病毒风险。按照国际细胞治疗学会提出且延续至今的最低标准来比较两种培养法培养的人脐带间充质干细胞是否有差异^[46], 实验结果表明血清替代物法培养的人脐带间充质干细胞大量表达CD105、CD73和CD90, 低表达CD45、CD34, 且均能诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞, 细胞形态更均一, 增殖速率较胎牛血清法略低。日本山中伸弥团队研究诱导性多能干细胞时发现oct4、sox2、nanog和c-Myc这4种因子的表达与干细胞的多能性有关^[47], 这4个主要因子表达正是干细胞多向分化的基础, c-Myc更多的是与肿瘤相关, 故本实验暂检测前3个因子, 结果表明两种培养法培养的间充质干细胞均表达oct4、sox2和nanog, 血清替代物法培养的细胞同样维持多能性。

胎牛血清对于间充质干细胞临床应用造成的限制以及外泌体的发展, 使得无血清培养法显然更有优势。虽然目前为止外泌体应用于临床仍落后于间充质干细胞, 但外泌体的发展前景不亚于间充质干细胞, 而无血清培养法则会被更广泛的应用, 成为以后一大趋势。

致谢: 感谢解放军昆明总医院临床实验科潘兴华教授以及各位老师给予的支持和帮助。

作者贡献: 实验设计为张学娟和刘高米洋, 实验实施为张学娟和刘高米洋, 实验评估为潘兴华和刘高米洋, 资料收集为张学娟、刘菊芬, 审校为宋乙甲、林庆铿、白盈盈。

经费支持: 该文章接受了“云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室(2015DG034)”、“全军实验动物专项(SYDW(2016)004)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究对象采用来自人体的细胞, 符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协

议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.
- [2] Castrechini NM, Murthi P, Gude NM, et al. Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche. *Placenta*. 2010;31(3):203-212.
- [3] Corotchi MC, Popa MA, Remes A, et al. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4):81.
- [4] Jin ES, Min J, Jeon SR, et al. Analysis of molecular expression in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells : prospects for use in the treatment of intervertebral disc degeneration. *J Korean Neurosurg Soc*. 2013;53(4):207-212.
- [5] Yang LM, Liu Y, Zhao J, et al. Characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells following tissue mass culture. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2014;60(1):12-18.
- [6] Gu F, Wang D, Zhang H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation for lupus nephritis patients refractory to conventional therapy. *Clin Rheumatol*. 2014;33(11):1611-1619.
- [7] Wang D, Li J, Zhang Y, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R79.
- [8] Wang D, Zhang H, Liang J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant*. 2013;22(12):2267-2277.
- [9] Woodworth TG, Furst DE. Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in treatment-refractory systemic lupus erythematosus nephritis: time for a double-blind placebo-controlled trial to determine efficacy. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):113.
- [10] Sun L, Wang D, Liang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2467-2475.
- [11] Santos Nascimento D, Mosqueira D, Sousa LM, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):5.
- [12] Kong D, Zhuang X, Wang D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2014;60(12):1969-1976.
- [13] Liu J, Han D, Wang Z, et al. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15(2):185-191.
- [14] Wang S, Cheng H, Dai G, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res*. 2013;1532:76-84.

- [15] Jiang Y, Zhu W, Zhu J, et al. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplant*. 2013;22(12):2291-2298.
- [16] Lv YT, Zhang Y, Liu M, et al. Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J Transl Med*. 2013;11:196.
- [17] Buyl K, Vanhaecke T, Desmae T, et al. Evaluation of a new standardized enzymatic isolation protocol for human umbilical cord-derived stem cells. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(6):1254-1262.
- [18] Mori Y, Ohshimo J, Shimazu T, et al. Improved explant method to isolate umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their immunosuppressive properties. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(4):367-372.
- [19] Iftimia-Mander A, Hourd P, Dainty R, et al. Mesenchymal stem cell isolation from human umbilical cord tissue: understanding and minimizing variability in cell yield for process optimization. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(5):291-298.
- [20] Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*. 1997;75(6):505-513.
- [21] Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*. 1997;89(3):776-779.
- [22] Spees JL, Gregory CA, Singh H, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*. 2004;9(5):747-756.
- [23] Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, et al. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2002;13(13):1605-1610.
- [24] Drach G, Maret A, Richard MF, et al. Transfer and induction of delayed hypersensitivity to methylated bovine serum albumin in the absence of adjuvant. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1977;284(23):2435-2437.
- [25] Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25(5):1270-1278.
- [26] Ding Y, Yang H, Feng JB, et al. Human umbilical cord-derived MSC culture: the replacement of animal sera with human cord blood plasma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2013;49(10):771-777.
- [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] 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.
- [29] 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.
- [30] Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007;47(8):1436-1446.
- [31] Mohammadi S, Nikbakht M, Malek Mohammadi A, et al. Human Platelet Lysate as a Xeno Free Alternative of Fetal Bovine Serum for the In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2016;10(3):161-171.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Liu ZZ, Chen P, Lu ZD, et al. Enrichment of breast cancer stem cells using a keratinocyte serum-free medium. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(18):2934-2936.
- [35] Huang D, Peng WJ, Ye Q, et al. Serum-Free Suspension Culture of MDCK Cells for Production of Influenza H1N1 Vaccines. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141686.
- [36] O'Loughlin AJ, Woffindale CA, Wood MJ. Exosomes and the emerging field of exosome-based gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2012;12(4):262-274.
- [37] Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(4):537-543.
- [38] Wahlgren J, Statello L, Skogberg G, et al. Delivery of Small Interfering RNAs to Cells via Exosomes. *Methods Mol Biol*. 2016;1364:105-125.
- [39] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 2011;6(4):481-492.
- [40] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-2902.
- [41] Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4142-4157.
- [42] Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(5):513-522.
- [43] Zhang B, Shen L, Shi H, et al. Exosomes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Identification, Purification, and Biological Characteristics. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1929536.
- [44] Li T, Yan Y, Wang B, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev*. 2013;22(6):845-854.
- [45] Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):34.
- [46] 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.
- [47] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.