

体外扩增间充质干细胞功能有效性与移植安全性评价研究进展

刘晶^{1,2}, 宋琳³, 邹伟⁴, 诸葛栋¹, 崔占峰²

1 大连医科大学附属第一医院 中英再生医学应用研究中心, 大连 116011

2 Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, U. K.

3 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024

4 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

摘要: 间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 具有多向分化潜能、免疫抑制能力、来源充足、可避免伦理学争议等优点, 使其有望成为种子细胞, 应用于临床干细胞移植治疗多种难治性疾病。目前通过生物反应器等方法已能实现 MSCs 的大规模体外扩增, 使体外获取足量移植用 MSCs 成为可能, 但扩增 MSCs 应用于临床移植前还存在着一个急需解决的问题, 即 MSCs 扩增后的安全性和移植有效性评价, 目前国内外在这方面研究尚不系统, 未建立起有效评价体系, 经检索还未发现有就扩增 MSCs 有效性和安全性的总结性资料。在全面检索相关文献基础上, 就 MSCs 扩增后临床应用有效性、移植安全性两大方面的研究进展作一综述, 希望对今后扩增 MSCs 临床移植提供参考。

关键词: 间充质干细胞, 扩增, 有效性, 安全性

Advances in efficacy and security of expanded mesenchymal stem cells *in vitro*

Jing Liu^{1,2}, Lin Song³, Wei Zou⁴, Dong Zhuge¹, and Zhanfeng Cui²

1 Centre for Regenerative Medicine, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

2 Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, U. K.

3 School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian 116024, China

4 School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

Abstract: The multipotent differentiation and immunosuppression capability of mesenchymal stem cells (MSCs) make it attractive source for stem cell therapy to treat serious diseases, including neural system diseases and immune disorders. For large scale clinical applications, MSCs have to be expanded to produce sufficient quantity for multiple treatments. While conventional passaging is not appropriate for such a task, bioreactor can be used to expand MSCs more efficiently. Yet the efficacy and biosafety of expanded MSCs must be properly assessed before the expanded MSCs can be implanted. This review presented state-of-the-art in expanding MSCs focusing on the progress on the assessment of the efficacy and biosafety of *in vitro* expanded MSCs. Current obstacles were discussed and future research directions were outlined.

Received: March 4, 2010; **Accepted:** August 19, 2010

Supported by: International Cooperation Program, Dalian Municipal Science and Technology Bureau (No. 2009F11GH179), Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

Corresponding author: Zhanfeng Cui. E-mail: zhanfeng.cui@eng.ox.ac.uk

大连市科技局国际合作项目 (No. 2009F11GH179), 教育部留学回国人员启动基金资助。

Keywords: mesenchymal stem cells, expansion, efficacy, security

长期以来,多种难治性疾病如中枢神经系统疾病、心血管系统疾病、糖尿病及自身免疫系统疾病等严重威胁着人类的健康与生命,彻底治疗这些疾病是人类一直未能解决的健康难题^[1]。1988年世界第一株人胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs) 系建立,其后成体干细胞的研究突飞猛进,随着该领域研究的深入,有关间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 治疗疾病的基础和临床研究更是显示出了令人欣慰的前景^[2-3], MSCs 移植有望成为难治性疾病最有前途的治疗策略。MSCs 来源于多种组织,包括骨髓、脐带血、外周血、脂肪等,但无论哪一种来源,其取材数量都是有限的,很难满足临床移植所需的细胞数量要求。因此科学家开始探讨体外扩增技术,以提高干细胞数量,现已能在体外实现数倍至数十倍扩增不等,从技术上保证了 MSCs 作为移植种子细胞的数量要求。但在其应用于临床之前,首当其冲就是要确保其在体内的功能有效性及移植安全性,本文就体外扩增间充质干细胞应用于临床的有效性及其安全性研究进展作一综述。

1 MSCs 体外扩增的研究现状

虽然 MSCs 在临床治疗上的前景和地位已经明确,但由于人体内干细胞来源数量有限,仅靠传统培养的方法难以在短时间内满足临床移植上对细胞数量的要求。因此, MSCs 的体外扩增方法的探索一直是干细胞研究领域的热点问题。国内外已竞相开展这方面研究工作,取得了一些进展。目前较为成功的扩增方法是通过生物反应器实现干细胞扩增。Chen 等^[4]利用旋转式生物反应器扩增人骨髓 MSCs,另外添加干细胞因子 (Stem cell factor, SFC)、白细胞介素-3 (Interleukin-3, IL-3) 和 IL-6,检测发现 Stro-1+CD44+CD34-的 MSCs 在 8 d 后可扩增 9 倍,成纤维细胞集落形成率 (Colony-forming efficiency-fibroblast per day, CFE-F/day) 是未用生物反应器扩增的对照组的 1.44 倍,扩增后的细胞可表达间充质干细胞早期标志波形蛋白 (Vimentin) 和 Endoglin (SH2),而分化细胞的标志如 II 型胶原、骨钙素 (Osteocalcin,

OC) 和 C/EBP- α 等则未检测到,并且这些细胞可分化为成骨细胞、成软骨细胞及成脂肪细胞。本课题组也利用生物反应器成功在体外扩增出 MSCs,如利用搅拌式生物反应器培养人胎盘来源的 MSCs,与用培养皿扩增的对照组细胞相比较,培养 144 h 后搅拌式生物反应器扩增的细胞数量是培养皿的 1.73 倍,并且 MSCs 的表型特征不变^[5]。通过气升式环流中空纤维膜生物反应器对兔骨髓 MSCs 进行三维动态培养,7 d 后可扩增 16 倍,扩增后大部分细胞呈 CD29+、CD44+、CD45-,保持 MSCs 的表型,并具有较强的成骨、成软骨和成脂的多向分化能力^[6]。这些研究表明,通过生物反应器不但可使 MSCs 在数量上得到扩增,还能够保证 MSCs 维持原本的表型和分化能力,符合临床移植用 MSCs 的基本生物学特征。

除了生物反应器,科学家们还发现了其他方法也有助于实现 MSCs 体外扩增。研究发现通过表面抗原筛选可以提高 MSCs 扩增效率。一般认为间充质干细胞的表面抗原情况与造血干细胞相反,即 CD31、CD34 为阴性,CD29、CD44、CD71、CD90、CD105、CD106、CD271 等为阳性。根据这一特性, Jarocha 等^[7]通过免疫磁珠分离纯化 CD105+CD271+ 的人骨髓 MSCs 并扩增,表达 CD105 和 CD271 的成纤维细胞集落生成单位 (Colony-forming unit-fibroblastic, CFU-F) 是未纯化细胞的 3~4 倍。此外,其他一些影响 MSCs 体外扩增的因素也陆续被报道。有研究者通过改善培养基质实现 MSCs 的体外扩增, Zangi 等^[8]用纤维蛋白微珠可有效将 MSCs 从大鼠骨髓中分离并且扩增。Kocaoemer 等^[9]用人 AB 血清和凝血酶激活的富含血小板血浆 (Thrombin-activated platelet-rich plasma) 分别作为扩增用血清,对人脂肪来源的 MSCs 进行扩增,结果表明第 6 代 MSCs 的扩增倍数分别为 66.6 ± 15.7 和 68.1 ± 6.7 ,而用胎牛血清扩增的倍数仅为 24.4 ± 0.7 。除基质材料与血清的优化外,一些生长因子也有利于 MSCs 的扩增。如 Tamama 等^[10]证实表皮细胞生长因子 (Epidermal growth factor, EGF) 可通过使 ERK 及 AKT 磷酸化

的途径刺激人骨髓 MSCs 增殖, Farre 等^[11]报道成纤维细胞生长因子-4 (Fibroblast growth factor-4, FGF-4) 可使 MSCs 的复制周期显著缩短且不改变其多向分化潜能。最近, Zscharnack 等^[12]还发现氧浓度也可影响 MSCs 的扩增, 他们通过比较 5% 和 20% 的氧气浓度下 MSCs 的扩增, 发现 5% 的氧浓度下 MSCs 形成的 CFU-F 比 20% 的氧气浓度多 2 倍, 并且老化程度也比 20% 的氧气浓度轻。

以上研究表明, 目前已能从技术上实现间充质干细胞的体外扩增, 但在大规模、系统地应用于临床治疗前, 急需解决的问题就是 MSCs 扩增后的功能有效性与移植安全性, 即在体外大规模扩增后, MSCs 是否具有与原始干细胞相同的自我更新和多向分化潜能、表达相同的标记蛋白, 以及是否具有致瘤性和移植带来的不良反应, 这是衡量与决定扩增 MSCs 移植能否应用到临床治疗的一个重要指标。因此必须在移植之前, 对扩增后的 MSCs 进行“身份”鉴定和安全检查。

2 扩增 MSCs 的有效性评价

扩增 MSCs 的有效性评价主要基于以下几个方面: 细胞的生物学特征如细胞形态; 特异性细胞抗原表达; 细胞因子表达谱; 细胞增殖能力; 细胞在一定条件下的分化能力等, 即这些扩增 MSCs 必须处在未分化的可以维持自我更新的状态。

如前所述, 一般认为 MSCs 表达 CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD105、SB-10、SH-3、SH-4 等表面抗原, 不表达造血干细胞的表面标志如 CD34, 单核细胞/巨噬细胞表面标志 CD14, 抗原呈递细胞即成纤维细胞表面标志 HLA-DR 等。Bruder 等^[13]在 1997 年就已证明在没有任何分化诱导物存在的条件下, 25 代前的 MSCs 形态、生长特点及表型特点等无显著性差异, 即 MSCs 的连续传代不会改变其基本性状。前面阐述的包括本课题组在内的有关大规模扩增 MSCs 的研究中, 也检测了扩增后的 MSCs 的表型特征, 均明确提出了扩增后的 MSCs 可以保持其表型不变, 细胞形态也与普通条件下培养的 MSCs 相同。

MSCs 具有多向分化潜能, 可分化为多种中胚层组织细胞, 如成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、成脂细胞等, 还可诱导分化为非中胚层的细胞如神经细胞和肝细胞^[14-16]等。成骨和成脂分化能力也是目前公认的鉴别 MSCs 的方法之一。许多学者在进行 MSCs 扩增研究时检测了扩增后的 MSCs 是否具有多向分化潜能。如本课题组^[6]及前面提到的 Chen 等^[4]的研究中, 均发现大规模扩增后的 MSCs 可分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞等, 能够维持其多向分化潜能。Zhang 等^[17]研制的二轴生物反应器结合聚己酸内酯-三钙磷酸 (Polycaprolactone-tricalcium phosphate, PCL-TCP) 材料培养人胎儿来源的 MSCs。相比于对照组, 细胞可在短时间内形成克隆, 其成骨分化能力也好于对照组。他们将反应器扩增出的 MSCs 移植入小鼠体内, 也可有效地分化为成骨细胞。这些研究提示扩增的 MSCs 具有与原始 MSCs 相同的特性, 具备临床应用的功能有效性, 具有作为临床移植种子干细胞的可能性。

MSCs 有广泛的细胞因子表达谱, 在体内可通过组织间隙作用于周围细胞, 发挥重要的旁分泌作用, 除诱导、调控造血干细胞和基质细胞的发育外, 还广泛参与免疫调节、细胞增殖、凋亡、内源性前体细胞再生、血管再生等病理生理作用。目前发现 MSCs 可分泌包括造血因子、非造血生长因子、白细胞介素、趋化因子以及多种生长因子、细胞因子受体、细胞黏附作用受体^[18-19], 表明 MSCs 的功能可能是通过自分泌和旁分泌发挥的。特别是近几年发现 MSCs 具有免疫抑制作用, 许多学者都认为 MSCs 的旁分泌是其中重要机制之一。因此 MSCs 的分泌作用也是判定 MSCs 功能有效性的标准之一。但是, 追溯了近十年的文献, 我们并未看到关于 MSCs 扩增后对其分泌作用的研究, 说明目前对扩增后 MSCs 有效性的评价尚不完善, 以后的研究应重视扩增后 MSCs 分泌作用的研究。

3 扩增 MSCs 的安全性评价

同其他植入技术一样, MSCs 无论扩增与否, 其应用于临床移植所面临的最大质疑就是安全性评

价。MSCs 由于其自身特点,安全性中主要涉及的问题就是致瘤性与免疫排斥。

3.1 致瘤性研究

2002 年 Science 杂志报道^[20],将人类胚胎干细胞植入帕金森病模型小鼠大脑内,发现 ESCs 可分化为多巴胺能神经元,对患病小鼠具有治疗作用,但一些小鼠却因 ESCs 转化的畸胎瘤而死亡。这一现象对 ESCs 是否适合于临床移植提出了质疑。同样,体外大规模扩增的 MSCs 是否也能够发生恶性转化而具有肿瘤细胞的特性?这是扩增 MSCs 应用于人体之前必须解决的问题。

曾有实验室发现体外长期培养的 MSCs 偶尔会出现“疯长”现象,2~3 d 即可长满传代。Rubio 等^[21]在 2005 年首次报道了体外长时间培养(4~5 个月)脂肪来源的人 MSCs 可自然发生恶性转化。后续研究中又发现脂肪来源的人 MSCs 在恶性转化后出现一些与肿瘤细胞相同的基因表达特征,如 p53、CDK2、CDK4、CDK6 等表达均高于正常的 MSCs^[22]。Li 等^[23]也发现连续培养 12 个月的小鼠骨髓 MSCs 可发生恶性转化,并且将 MSCs 移植入老年小鼠 18~24 个月,小鼠体内可见纤维肉瘤形成。

事实上,干细胞与肿瘤之间的关系一直是研究者广泛关注的问题。在关于肿瘤起源的假说中即有肿瘤起源于干细胞的观点,近几年也提出了肿瘤干细胞这一说法。许多学者认为,干细胞在长期的自我更新过程中(如传代次数或扩增倍数过多时)增殖调控途径中某些基因发生突变或表达异常,从而引起细胞过度增殖,导致癌变。例如, Serakinci 等^[24]利用人 MSCs 研究干细胞形成肿瘤的过程,将端粒酶 hTERT 转染至 MSCs 中构建细胞系 hMSC-TERT20,当细胞群体倍增水平(Population doubling level)达到 256 时,细胞失去接触抑制。将这些细胞注射入 10 只小鼠,均能在体内形成肿瘤。通过检测发现,hMSC-TERT20 细胞系由于启动子超甲基化,细胞周期相关基因 DBCCR1 表达缺失,从而发生癌变。

前面提到的 Zhang 等^[17]研制的二轴生物反应器,他们在体内实验中发现扩增后的 MSCs 移植入小鼠体内后并未发现肿瘤。在更高级的灵长类动物

也获得令人欣慰的结果,Liu 等^[25]用流式细胞仪分离 Flk-1(+)/CD31(-)/CD34(-)的猴和人骨髓来源的 MSCs,体外扩增 6 代之后移植入活体内,宿主无任何异常。这些结果提示在扩增倍数适当的情况下 MSCs 移植宿主可能不会致瘤。

但是,经扩增后的 MSCs 在应用于临床治疗之前对其致瘤性进行严格检测和全面评估以确保人体移植的安全是十分必要的。目前检测致瘤性的主要方法有:形态学观察;细胞周期检测;刀豆蛋白 A 凝集试验(检测细胞表面结构改变);软琼脂克隆形成实验(检测锚定非依赖性生长, Anchorage independent growth);细胞核型分析;动物体内致瘤性;组织化学等,现有的扩增 MSCs 致瘤性评价也是基于以上检测标准,为了充分保证扩增 MSCs 移植的安全性,有必要从肿瘤细胞的多种特性入手,建立更全面的致瘤性评价体系。

3.2 免疫抑制作用

造血干细胞是最早应用于临床移植的干细胞,已有过移植后出现不良反应的报道,主要的并发症之一是移植物抗宿主病(Graft versus host disease, GVHD)。GVHD 是指供体的免疫活性细胞对免疫功能低下的受体抗原产生排斥反应的疾病,严重时会造成患者死亡。因而免疫排斥问题一直被认为是干细胞临床治疗的一大安全障碍,扩增 MSCs 能否应用于临床首先也需要评价其免疫排斥能力。目前已证实, MSCs 不表达 MHCII 类分子、FasL、B7-1、B7-2、CD40 等,低表达 MHCII 类分子,从理论上将可避免受体免疫系统的杀伤作用。2000 年, Liechty 等^[26]在妊娠早期的胎羊免疫功能发育前后,分别将人 MSCs 植入胎羊体内。在这样一个异基因体系中,人 MSCs 可存活长达 13 个月之久,移植后的 MSCs 还可分化为软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、心肌细胞等多种细胞。令人惊奇的是,在胎羊免疫功能发育后,人 MSCs 也能长期存活而无排斥反应。他们因此预言了 MSCs 在临床移植、组织工程及细胞、基因治疗方面的巨大潜能,这要归功于 MSCs 的一项独特优点——低免疫原性^[27]。

2003 年 Tse 等^[28]发现,当 MSCs 与同种外周血单核细胞或同种异体 T 淋巴细胞混合培养时, MSCs

不会引起 T 细胞的增殖,也不能刺激外周血单核细胞释放 γ -干扰素,而作为对照组的成纤维细胞则能够刺激这一过程,这表明 MSCs 具有免疫抑制作用。Ye 等^[29]的研究还发现,大鼠骨髓 MSCs 与同种异体 CD3+的 T 细胞共培养时,在 T 细胞增殖受抑制的同时,致炎细胞因子如肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平降低,抗炎因子如转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-10 的水平增高。进一步研究表明, MSCs 对 T 细胞的免疫抑制具有 2 个特点:一是免疫效应为剂量依赖性^[28],即 MSCs 的数量越多,抑制效果越强。二是这种免疫抑制效果是可逆的^[30],即在有刺激物如植物血凝素 (Phytohaemagglutinin) 存在时将 MSCs 移去, T 细胞的增殖即可回复到无 MSCs 存在时的水平。除 T 细胞外, MSCs 还能抑制 B 淋巴细胞、树突状细胞 (Dendritic cells, DCs) 及自然杀伤 (Natural killer, NK) 细胞的增殖,并且均不会引起它们的凋亡^[31-35]。

鉴于这一特性,目前许多临床研究中甚至尝试利用 MSCs 治疗一些疾病如 GVHD、I 型糖尿病及类风湿性关节炎等自身免疫性疾病。Ringden 等^[36]给 8 位患有类固醇抗药性的 3-4 级急性 GVHD 患者和 1 位广泛性慢性 GVHD 患者注入平均为 1×10^6 个 MSCs 细胞/kg 体重,结果显示其中 6 位急性患者痊愈(除 1 位患有巨型细胞病毒急性胃肠炎)。另外 2 位注射 MSCs 后无明显效果,死亡。5 位患者在移植后 2 个月至 3 年内仍存活,存活率显著高于同时期未经 MSCs 治疗的另外 16 位 GVHD 患者。Le Blanc 等^[37]于 2001 年 10 月至 2007 年 1 月跟踪了 55 位急性 GVHD 的患者,细胞来自 HLA 相同同胞供体、单倍体相同的供体和第三方 HLA 不全相合供体。研究发现其中 30 位患者完全治愈,9 位患者病情得到改善。在注射 MSCs 期间和注射之后无患者出现不良反应,治愈程度与供体的 HLA 匹配程度无关。I 型糖尿病是 T 细胞介导自身免疫系统对胰岛的 β 细胞攻击的一种疾病,通过体内和体外实验,他们发现 MSCs 可降低 T 细胞活性从而阻止其侵入到胰岛而引发糖尿病, Vija 等^[38]还证实 MSCs 可抑制 T 细胞介导的免疫反应对新生胰岛 β 细胞的攻击。类风

湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 也是由自身免疫障碍导致免疫系统攻击关节的慢性免疫性疾病,有研究发现^[39-41],在体外 MSCs 可抑制 T 细胞的增殖、免疫应答及其产生的因子如 γ -干扰素和 TNF- α ,降低炎症反应并抑制来自 RA 患者滑膜细胞产生的基质降解酶,因而是一种很有潜力的治疗胶原诱导性 RA 的新方法,并且在动物实验中也取得了较好的效果。Gonzalez 等^[42]将人脂肪来源的 MSCs 注入到患有胶原诱导性 RA 的小鼠中,成功缓解了病情,并且降低了发病率。

由此看来,间充质干细胞的免疫抑制特性使其在临床应用上的安全性高于其他成体干细胞,许多学者认为 MSCs 将在预防 GVHD、排斥反应及细胞治疗等领域能够发挥有效作用。遗憾的是,目前仍缺乏关于扩增后的 MSCs 是否能够完整保持免疫抑制及抗 GVHD 特性的研究。本课题组自行研制灌注式三维微生物反应器,利用灌注细胞系统和三维细胞培养的双重优势,通过连续动态灌注细胞培养使反应器的环境更接近细胞在体内的生长状态,并实现了微环境的流动变化效应。前期实验发现,利用该反应器培养 MSCs,能够逼真地模拟循环的体内微环境,较好地支持 MSCs 的生长,实现高效、可重复 MSCs 体外扩增^[43]。下一步我们计划利用该微生物反应器开展 MSCs 体外扩增,进而深入研究扩增后 MSCs 的致瘤性及抗 GVHD 特性。希冀不久的将来能够对扩增后的 MSCs 免疫抑制作用有一个完整系统的评价,为扩增后的 MSCs 临床应用上的安全性论证提供依据。

4 展望

毋庸置疑, MSCs 移植给严重危害人类生命、降低人类生活质量疾病的治疗带来了无限希望, MSCs 扩增技术的发展也为在体外获取足量种子细胞提供了可能,但毕竟 MSCs 临床应用的研究尚属起步阶段,扩增 MSCs 更是由于其体外所经历的复杂培养过程及辅助试剂、药物的参与等,在临床应用前还有诸多问题需要解决。必须在获得稳定扩增效果的基础上构建一个立体全面的扩增 MSCs 有效性、

安全性的评价体系, 保证 MSCs 临床治疗安全化、规范化, 才能推动 MSCs 的临床应用进程。

REFERENCES

- [1] Brown RH Jr. Developmental biology: neuron research leaps ahead. *Science*, 2008, **321**(5893): 1169–1170.
- [2] Sharp J, Keirstead HS. Stem cell-based cell replacement strategies for the central nervous system. *Neurosci Lett*, 2009, **456**(3): 107–111.
- [3] Sendtner M. Stem cells: tailor-made diseased neurons. *Nature*, 2009, **457**(7227): 269–270.
- [4] Chen X, Xu HB, Wan C, *et al.* Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(9): 2052–2059.
- [5] Yu YQ, Li K, Bao CY, *et al.* *Ex vitro* expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **159**(1): 110–118.
- [6] Li XQ, Liu TQ, Zhu L, *et al.* Culture and expansion of mesenchymal stem cells in air-lift loop hollow fiber membrane bioreactor. *J Chem Eng Chin Univ*, 2008, **22**(6): 985–991.
李香琴, 刘天庆, 朱琳, 等. 气升式环流中空纤维膜生物反应器内骨髓间充质干细胞的培养与扩增. 高校化学工程学报, 2008, **22**(6): 985–991.
- [7] Jarocho D, Lukasiewicz E, Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105⁺ and CD271⁺ cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008, **46**(3): 307–314.
- [8] Zangi L, Rivkin R, Kassiss I, *et al.* High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads. *Tissue Eng*, 2006, **12**(8): 2343–2354.
- [9] 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.
- [10] Tamama K, Fan VH, Griffith LG, *et al.* Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(3): 686–695.
- [11] Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, *et al.* FGF-4 increases *in vitro* expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors*, 2007, **25**(2): 71–76.
- [12] Zscharnack M, Poesel C, Galle J, *et al.* Low oxygen expansion improves subsequent chondrogenesis of ovine bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogel. *Cells Tissues Organs*, 2009, **190**(2): 81–93.
- [13] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997, **64**(2): 278–294.
- [14] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000, **109**(1): 235–242.
- [15] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998, **279**(5356): 1528–1530.
- [16] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, **109**(10): 1291–1302.
- [17] Zhang ZY, Teoh SH, Chong WS, *et al.* A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, **30**(14): 2694–2704.
- [18] Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, *et al.* Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, **10**(1): 125–140.
- [19] Pei XT. Stem Cell Technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 35.
裴雪涛. 干细胞技术. 北京: 化学工业出版社, 2002: 35.
- [20] Vogel, G. Rat brains respond to embryonic stem cells. *Science*, 2002, **295**(5553): 254–255.
- [21] Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 2005, **65**(8): 3035–3039.
- [22] Rubio D, Garcia S, Paz MF, *et al.* Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE*, 2008, **3**(1): e1398.
- [23] Li HC, Fan XL, Kovi RC, Jo Y, *et al.* Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, **67**(22): 10889–10898.
- [24] Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, *et al.* Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene*, 2004, **23**(29): 5095–5098.
- [25] Liu L, Sun Z, Chen B, *et al.* *Ex vivo* expansion and *in vivo* infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34-

- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells Dev*, 2006, **15**(3): 349–357.
- [26] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, *et al.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nat Med*, 2000, **6**(11): 1282–1286.
- [27] Maitra B, Szekely E, Gjini K, *et al.* Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*, 2004, **33**(6): 597–604.
- [28] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, *et al.* Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, **75**(3): 389–397.
- [29] Ye Z, Wang Y, Xie HY, *et al.* Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, **7**(6): 608–614.
- [30] Krampera M, Glennie S, Dyson J, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003, **101**(9): 3722–3729.
- [31] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, **99**(10): 3838–3843.
- [32] Krampera M, Cosmi L, Angeli R, *et al.* Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(2): 386–398.
- [33] Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, *et al.* Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 2006, **107**(4): 1484–1490.
- [34] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006, **107**(1): 367–372.
- [35] Jiang XX, Zhang Y, Liu B, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2005, **105**(10): 4120–4126.
- [36] Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 2006, **81**(10): 1390–1397.
- [37] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 2008, **371**(9624): 1579–1586.
- [38] Vija L, Farge D, Gautier JF, *et al.* Mesenchymal stem cells: stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab*, 2009, **35**(2): 85–93.
- [39] Liu M, Han ZC. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J Cell Mol Med*, 2008, **12**(4): 1155–1168.
- [40] Zheng ZH, Li XY, Ding J, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, **47**(1): 22–30.
- [41] Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T-cell responses and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2010, **69**(1): 241–248.
- [42] González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, *et al.* Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 2009, **60**(4): 1006–1019.
- [43] Cui ZF, Xu X, Trainor N, *et al.* Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. *Toxicol In Vitro*, 2007, **21**(7): 1318–1324.