

模拟干细胞生长微环境以促进间充质干细胞的扩增

娄向新 袁卉华 包敏 张彦中*

(东华大学化学化工与生物工程学院仿生材料与再生医学研究室, 上海 201620)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是当前在多种组织再生和细胞治疗研究中被最广泛采用的一类干细胞。但如何诱导MSCs的体外高效扩增并维持其干性特征(stemness), 从而为临床应用提供充足、优质的细胞源, 是当前基础研究和临床治疗中遇到的瓶颈问题。日益增多的研究表明, 机体内干细胞的自我更新与分化受其所处体内微环境的紧密调控。因此, 精确模拟干细胞在体内生长的微环境已成为提高干细胞体外扩增效率的重要策略。该文就近期研究中如何模拟干细胞生长微环境诱导MSCs体外扩增并维持干细胞特性的研究做一综述, 为今后MSCs的高效扩增和推进临床运用与转化提供思路。

关键词 间充质干细胞; 微环境; 扩增

Expansion of Mesenchymal Stem Cells by Microenvironmental Simulation

Lou Xiangxin, Yuan Huihua, Bao Min, Zhang Yanzhong*

(Laboratory of Biomimetic Biomaterial for Regenerative Medicine, Department of Bioengineering, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract Nowadays, mesenchymal stem cells (MSCs) have been most commonly utilized in a variety of cell therapies and tissue regenerations. But how to achieve efficient expansion of MSCs with retained stemness for clinical application remains a ‘bottleneck’ problem to be addressed in the basic research and clinical treatment. A growing number of studies have shown that the self-renewal and differentiation of MSCs could be precisely regulated by their microenvironment *in vivo*, so precise simulation of the *in vivo* microenvironment has become a rational strategy for MSCs expansion. This review aims to summarize the recent advances on simulating stem cell growth microenvironment to induce MSCs amplification with preserved stemness characteristics *in vitro*. A comprehensive understanding of this field may provide guidance for efficient expansion of MSCs to accelerate the application and transformation of the MSCs in the clinical settings.

Key words mesenchymal stem cells; microenvironment; expansion

MSCs(mesenchymal stem cells)是目前细胞治疗和组织再生研究最热点的成体干细胞。与造血干细胞(供体来源少, 很难形成三维组织)及胚胎干细胞(致瘤性、免疫原性和伦理学问题)相比, MSCs有

其独特的优点^[1], 主要包括: (1)可自体来源、采集方便、取材损伤小; (2)具有自我更新和多向分化潜能; (3)生物安全性好; (4)免疫原性低; (5)无伦理道德问题的限制等特征。正是由于上述优点, MSCs已成为

收稿日期: 2013-06-05 接受日期: 2013-08-05

中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(批准号: 13D110523)和东华大学青年教师科研启动项目(批准号: 13D210502)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-67792374, E-mail: yzzhang@dhu.edu.cn

Received: June 5, 2013 Accepted: August 5, 2013

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.13D110523) and Donghua University Scientific Research Foundation for Youths (Grant No.13D210502)

*corresponding author. Tel: +86-21-67792374, E-mail: yzzhang@dhu.edu.cn

网络出版时间: 2013-10-15 16:51 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131015.1651.003.html>

当前细胞替代治疗和三维组织再生研究中最受关注的细胞源,也是这一领域距离临床应用最为接近的一类干细胞。然而,目前从不同组织取材和分离的MSCs的数量远远满足不了基础研究和临床运用的需要。同时研究也显示,体外培养的MSCs随着传代次数增加其增殖潜能逐渐降低直至丧失^[2]。因此,当前亟需研发新型的MSCs体外培养和扩增体系来获得大量的维持干性的MSCs。

模拟干细胞微环境实现MSCs大量扩增是MSCs获得临床实际应用的物质基础。但近年来,人们将注意力多集中在诱导干细胞分化以用于特异组织构建或疾病治疗的研究上,而对MSCs所生存的天然微环境及干性维持的作用机制的认识仍十分有限,在技术层面上也还没有找到较为理想的MSCs扩增方法。目前,现有的文献报道已初步展示模拟微环境(如细胞因子与蛋白^[2]、理化信号^[3]及力学刺激^[4])在促进干细胞的干性扩增方面的益处。此外,从培养体系上看,三维立体培养比二维培养更接近生物体内的微环境,能够容纳高密度细胞的黏附与增殖,有利于细胞间信号传递和细胞因子的相互作用,并为维系细胞的代谢活动提供适宜的微环境^[5]。因此,今后如何通过体外模拟体内干细胞生长的三维微环境来高效扩增MSCs已成为干细胞研究领域的重要方向。

本文对近年来模拟体内干细胞生长微环境的系列因素,包括生物化学信号因子、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、仿生三维支架材料、物理因素和力学刺激等来增强MSCs活性与功能和促进MSCs自我更新和增殖,从而实现MSCs体外高效扩增的相关研究做出综述,以期为推进MSCs扩增技术的完善和进步提供借鉴和指导。

1 生物化学信号因子调控MSCs的自我更新和增殖

MSCs在成体内广泛分布于骨髓、脂肪、皮肤和血管等多种组织,其中以骨髓和脂肪内的含量相对较多。在同一组织中,MSCs通常分布于多个位置,因此对其在组织内的具体定位仍有待于进一步认识。同时,以往研究对构成MSCs生长的微环境以及相邻细胞成分的了解更是知之甚少^[6]。与一般细胞微环境相似,细胞因子是MSCs微环境的重要组成部分。大量研究证实,在体外培养的骨髓MSCs中添加某些生长因子,如IL-1,3,6,7,17、EGF、FGF-2,4,8、

PDGF等^[7-13]可以促进干细胞的增殖。另外,也有报道在培养液中加入TGF- β 可促进MSCs增殖,然而高浓度时则表现为抑制^[14]。bFGF和BMP-2对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的增殖具有重要的促进作用, Akino等^[15]发现体外培养的人间充质干细胞在bFGF或BMP-2单独作用或合用两天后,其细胞数与对照组相比显著增长,显示了bFGF或BMP-2促进MSCs增殖的作用。Taira等^[16]将维生素C与bFGF协同作用,可显著增加bFGF对细胞的增殖效应。另外,有研究显示PDGF可以通过ERK途径来调节人来源的MSCs相关增殖基因的表达,从而促进它的增殖^[17]。然而,以上研究只是从不同角度一定程度上实现对MSCs的增殖能力的调控,真正如何利用生物信号因子对MSCs的调控作用,实现MSCs的高效扩增且细胞的分化功能得以保留,仍是今后研究亟待解决的问题。同时,以往研究虽然证实了这些因子对细胞增殖具有促进作用,但微环境中包含了哪些关键的因子成分,多种因子之间是否存在协同作用?这些问题仍有待进一步阐明。

2 体外模拟ECM调控MSCs扩增

2.1 细胞外基质对MSCs扩增的诱导作用

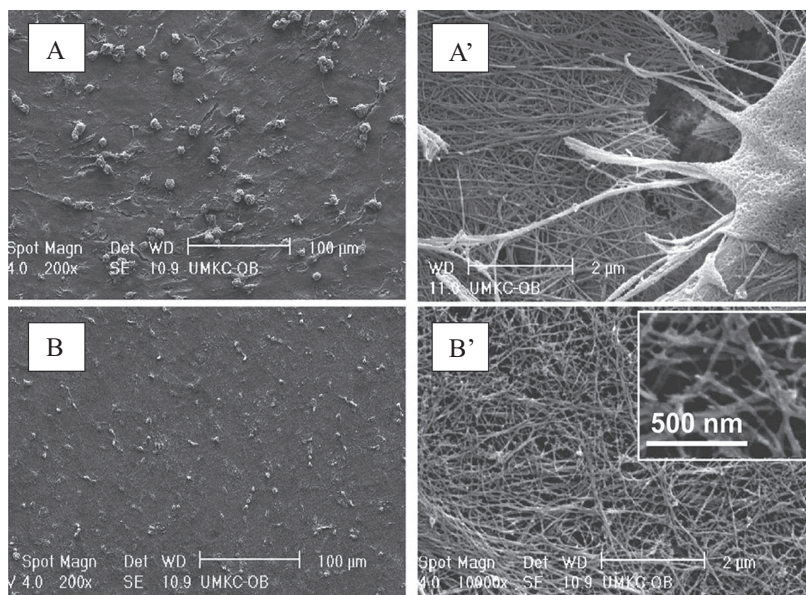
ECM是组成间质和上皮-血管中基质的不溶性结构成分。它不仅是细胞的机械支持结构,也是供给营养和免疫应答的场所。ECM参与调节胚胎发育进程,决定细胞的黏附与迁移,在创伤修复和纤维化、细胞的生长、增殖、分化、代谢和肿瘤发生及转移中均起着重要作用^[18]。作为MSCs微环境的一个重要组成部分,研究发现在纤维黏连蛋白铺层的培养皿中扩增的MSCs,可以更好地维持多向分化能力^[19]。最近,陈晓东课题组建立了一种采用MSCs细胞外基质铺层培养骨髓MSCs的方法,该培养技术系统模拟了MSCs的胞外基质成分,同时还可能保留了生长因子等活性成分,可使干细胞的扩增效率得到明显提高^[18,20]。这一培养体系的基本操作是首先在普通培养皿中培养骨髓基质细胞(stromal cell),待细胞长满后去除活细胞,保留细胞分泌的胞外基质成分,随后以此培养皿为载体,进一步培养扩增新的MSCs。该研究不仅证实了胞外基质在骨髓MSCs微环境中的重要作用,同时也为研究干细胞微环境提供了重要的体外模型。值得指出的是,虽然胞外基

质诱导MSCs增殖的方法效果显著, 但扩增效率很不稳定, 不同代次和状态的细胞制备出来的细胞外基质之间的MSCs扩增效率有较大差异, 高代次的年老细胞制备的基质明显不如低代次的年轻细胞。有趣的是, Chen等^[18]的工作也揭示了骨髓源ECM与其他细胞外基质一样也是由纳米级的超细纤维构成的这一基本事实, 如图1所示。他们的工作提示, 基于模拟干细胞微环境的ECM的干细胞培养和扩增方法, 将为大规模扩增具高度功能性的MSCs提供新的思路并有着较高的可行性。因此, 进一步分析胞外基质中的关键成分以指导对仿生支架材料的修饰, 进而建立规模化的干细胞培养和扩增的微环境十分必要。

2.2 仿生三维支架材料模拟体内干细胞微环境扩增MSCs

利用纳米技术模拟微环境制备仿ECM支架已引起了人们的极大兴趣, 尤其是以电纺纳米纤维支架为代表^[21-22]。电纺丝(Electrospinning)是一种采用静电力制备纤维细度达纳米级的超细纤维制备技术。由于电纺纳米纤维在尺寸和形态上对ECM组分的独特仿生特性, 自2002年电纺纳米纤维被首次报

道用于组织工程支架以来^[22], 这类仿生纳米纤维已被广泛研究用于软骨、骨、皮肤、肌腱、韧带、血管和神经等组织的构建研究^[23], 成为当今组织工程再生医学支架材料研究的热点之一。大量的研究表明, 与传统其他类型的组织工程支架相比, 电纺纳米纤维支架可通过组分复合^[23]、壳-芯结构设计^[24]、纤维取向^[25]、生物活性分子的化学嫁接^[26]等方式明显促进细胞的黏附、增殖、分化及相关功能表达。更重要的是, 仿生纳米纤维不仅支持干细胞扩增时的干性维持^[27], 还有利于干细胞分离纯化时的快速捕获^[28]。此外, 有证据表明, 纳米纤维的高比表面积提供了更多的细胞黏附位点, 这为生物力学刺激通过纳米纤维向MSCs传导提供了有效途径。这些结果说明, 利用电纺纳米纤维模拟MSCs生存的微环境, 探索它们之间的相互作用关系有着极高的仿生优越性和可行性。然而, 目前的绝大多数研究工作都是基于二维纤维膜上的简单细胞培养和扩增, 制备出理想的三维纳米纤维支架来重建MSCs体内的生长微环境仍然是有待解决的关键问题^[29]。利用纳米仿生技术已经使精确构建与干细胞/天然组织微环境类似的生物材料支架(仿生细胞外基质)的研究和应用迈上了



A: 骨髓细胞衍生ECM在去除细胞前的低放大倍数SEM图像; A': 高放大倍数下去除细胞前的ECM的图像; B: 培养的骨髓贴壁细胞产生的ECM在去除细胞后的低放大倍数图像; B': 高放大倍数下去除细胞后的ECM图像, 插入图片显示的是细胞去除之后高放大倍数下的图像(根据参考文献[18]改编)。

A: at low magnification, SEM image of marrow cell-derived ECM before removing cells; A': high magnification of the ECM made by cultured marrow adherent cells before cell removal; B: at low magnification, the structure of the ECM after cell removal; B': high magnification of the ECM image after cell removal. (Inset) enlargement of high-magnification image after cell removal (modified from reference [18]).

图1 小鼠骨髓细胞衍生ECM的特征

Fig.1 Characteristics of murine marrow cell-derived ECM

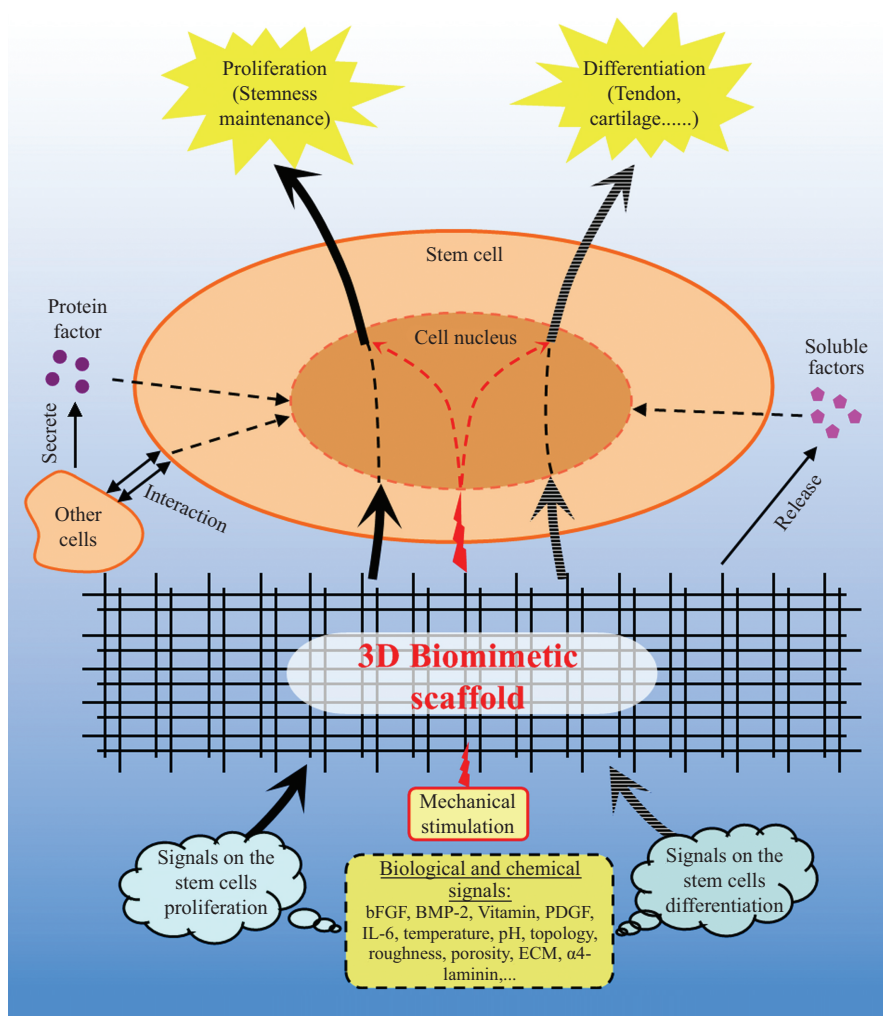


图2 仿生纳米纤维支架复合生化因子、生物及物理信号等多因素调控干细胞的增殖、干性维持与分化

Fig.2 Effect of combination of nanofibrous scaffolds with biochemical factors, biological and physical signals on the stem cells proliferation, stemness maintenance and differentiation

一个新台阶。然而,要真正利用仿生三维纳米纤维支架模拟干细胞微环境,实现MSCs的高效扩增还有诸多问题需要解决:(1)研制出适宜MSCs黏附和生长的新型三维仿生纳米支架;(2)将仿生支架材料与生物、化学等调控因素(如胶原、短肽、生长因子)进行合理地整合,使其具有细胞黏附、识别、引导和诱导等作用;(3)从仿生纳米支架的物理(拓扑、刚度、亲水性等)和生化因素等多个方面探索其对增加干细胞的增殖、干性维持与定向分化的调控作用和机制(图2)。

3 物理因素对MSCs扩增和干性维持的重要作用

细胞的正常生命活动离不开与其周围环境的相互作用,其在体内的生长环境是一个具有复杂网

络的微环境,受到各种条件的影响。这些因素调节和制约着细胞的黏附、增殖、迁移和分化。因此无论何种培养方式与培养系统,对培养条件的优化都是必不可少的,其中物理因素,如接种密度、无血清培养和氧分压都是可从不同层面影响MSCs增殖的因素。通过运用一种或几种物理因素来有效调控MSCs增殖以及干细胞特性维持,是实现MSCs体外大量扩增和应用于临床的重要前提和基础。

3.1 接种密度

细胞接种密度是影响细胞扩增的一个重要因素。目前关于细胞接种密度方面的报道较少,有研究将日本白兔骨髓MSCs接种到胶原蛋白凝胶,检测接种密度分别为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 情况下对软骨细胞增殖和分化的影响^[30]。结果显示,细胞的接种密度与增殖能力成反比,三个星期后

$2 \times 10^5/\text{mL}$ 组的扩增倍数最大为6, $2 \times 10^6/\text{mL}$ 组的扩增倍数为3, 而 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 组的细胞经过三个星期的培养后细胞数量反而下降。但从组织工程的角度看, 在保持原本基因型的基础上增加细胞的量可有效提高基质的生成量, 从而可提高细胞移植的成功率。对于单纯的扩增培养来说, 适当降低细胞的接种量可提高扩增倍数, 以获得相当数目的细胞储备。有一点需要注意的是, 在过低细胞密度的生长环境中, 细胞与细胞之间缺乏合作和细胞信号传导^[31], 亦不利于细胞的扩增。因此应针对不同的细胞在不同微环境的生长特点, 来确定细胞的初始密度。

3.2 氧分压

氧是干细胞所处微环境的一个重要的组成成分, 在维持细胞增殖和可塑性方面起着重要的作用。氧不仅参与细胞的代谢, 还参与了细胞体内的信号传导。在体外的开放式培养, 大气的氧分压大约是20%, 在体内骨髓里的氧压较低, 大概为1%~7%, 因此常规培养中的氧分压比较高。Grayson等^[32-33]研究MSCs在三维材料上的生长实验表明, 2% O_2 的培养条件下, 能够促进人来源的MSCs的自我更新和增殖, 使干细胞标志基因如Oct-4和Rex-1的表达上调, 并且细胞的克隆能力也明显提高。Hung等^[34]研究表明, 低氧下培养的MSCs比常氧条件下的MSCs更能抑制内皮细胞的凋亡, 提高存活率和血管的形成, 创造一个可控的氧压梯度能加强MSCs的血管生成能力。当前三维材料用于干细胞培养是研究热点, 不同于二维培养, 在三维培养中, 细胞对氧的利用受到支架材料、胞外基质的分泌和扩散特点的影响。目前, 体外还不能精确模拟体内的氧环境, 对于低氧对干细胞的增殖促进效应的调控机制也所知甚少, 用低氧来大量扩增MSCs的应用还有待于进一步研究。

3.3 无血清培养

血清是一种成分不明的复杂混合物, 含有生长因子、毒素清除剂及一些其他蛋白。在常规的细胞培养中, 血清对细胞的增殖与分化不可或缺。但血清的成分比较复杂, 不同来源、不同批次的血清差别也很大, 而且动物来源的血清极有可能携带病源, 不适合在临床应用中大量使用, 因此应积极开发无血清培养基。对于无血清培养体系的研究, 首要就是要研究血清成分代替物。Liu等^[35]研究发现, 培养基添加17.91 ng/mL bFGF、2.80 mg/mL人血清白蛋白、27.65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 乙醇胺和1.18%的SITE作为无

血清培养体系可显著提高MSCs的增殖能力。血清白蛋白具有多种生理功能, 包括清除毒素、作为脂肪酸和微量元素的载体等。SITE是亚硒酸盐、胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺的混合物, 是无血清体系中常用来促进细胞黏附和增殖的物质。亚硒酸盐是谷胱甘肽过氧化物酶的辅酶, 参与细胞的抗氧化过程; 胰岛素作为一种诱导剂参与脂肪酸和糖原的合成; 转铁蛋白是血液中最丰富的转运蛋白, 它携带铁离子跨膜进入细胞内部, 可促进细胞的生长; 乙醇胺是磷脂酰乙醇胺的一个结构分子, 是哺乳动物细胞膜中最丰富的磷脂质。以上研究表明, 一些血清替代物, 如生长因子、细胞因子或特异蛋白作为无血清培养体系的添加物可以促进细胞的生长, 无血清培养在细胞生长和细胞生物学的研究中有很大的应用潜质。尽管无血清培养体系具备较好的稳定性、较长的保质期和操作简便性等优点, 但使用中仍可能存在传播异种蛋白、交叉感染和免疫反应等问题^[36]。同时, 目前无血清体系仍无统一规范化标准, 其成分稳定性和使用安全性还有待进一步研究。Brunner等^[37]公布了无血清培养液的配制数据信息库为研究者提供方便: <http://www.goodcellculture.com>。

总之, 在MSCs培养过程中调整或施加一定条件下的物理因素可以更好地促进MSCs增殖和维持其干细胞的分化潜能^[35,38]。然而, 这些物理信号是通过什么信号通路调控干细胞的生长或分化特性, 这些信号通路与生长因子、胞外基质所传递的信号通路是否存在协同作用等关键问题仍不明确。阐明这些问题可以为筛选特异性调控MSCs自我更新和增殖的分子信号通路, 进而为通过物理因素来体外有效扩增MSCs提供思路。

4 三维扩增系统通过力学刺激促进MSCs扩增

干细胞的体外培养与扩增中采用的静态培养体系有着很多的缺点和弊端, 若要将干细胞推向临床应用及产业化等实际应用, 利用生物反应器培养MSCs能够实现规模化扩增, 通过施加一定程度的力学刺激进行MSCs的三维培养, 实现大规模扩增是该领域的发展趋势^[39]。

4.1 搅拌式(悬浮式)生物反应器

搅拌式反应器(stirred suspension culture system)多用于悬浮细胞的培养, 目前主要用于疫苗和干

扰素的生产。造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HSPCs)是最早用生物反应器进行培养的干细胞, HSCs和HSPCs在搅拌或悬浮生物反应器中具有更好的扩增效果^[40-41]。但在此类反应系统中, 由于外部机械搅拌装置的存在, 细胞直接暴露在流体的剪应力之下, 搅拌速度过快容易对细胞造成机械损伤, 破坏细胞的完整性; 搅拌速度慢则不利于传氧传质。此外, 在搅拌过程中会产生泡沫, 易引起污染, 从而限制了其应用范围, 因此需要研制剪切力小、混合性能好的新型细胞培养系统。

4.2 旋转生物反应器

旋转生物反应器(rotary cell culture system, RCCS)是模拟体内空间微重力效应而设计的一种生物反应器, 是一个采用水平旋转的细胞组织培养系统, 可结合微载体进行大规模细胞培养。在RCCS中共培养扩增人源性的MSC和HSCs, 仅8 d反应器中Stro-1-CD44-CD34-MSCs和CD34-CD44-Stro-1-HSCs的细胞量就到达了最大值, 是传统培养方法的1.4倍。而且扩增后的人源性MSCs可诱导分化为成骨、成脂和软骨细胞, 仍保持其分化潜能^[42]。但是细胞的生长周期很短, 8 d以后细胞的数量开始下降。到培养后期, RCCS中的细胞容易产生团聚现象, 所以不能支持高密度的细胞培养。另外在悬浮培养中, 微载体和生物反应器壁之间的碰撞可造成细胞的机械性损害, 破坏细胞黏附和微载体上的基质沉积。

4.3 中空纤维膜反应器

中空纤维膜反应器(hollow fiber membrane system)由内径约为200 μm 、壁厚为50~70 μm 的中空纤维管组成, O_2 和 CO_2 等小分子可以自由透过管壁膜扩散。中空纤维膜既可以增大细胞培养面积又可以起到载体的作用, 实现营养物质传递效率的提高及代谢产物的及时排出。其缺点是细胞种植时较不均匀, 培养液进入端细胞会较多, 同时营养成分也会由培养液进入端至出口端形成递减的梯度^[43]。中空纤维生物反应器中空纤维膜容易破坏, 整个系统不太稳定, 中空纤维膜中传质不均, 营养物质存在明显梯度, 细胞容易遭受营养缺乏, 这些不足限制了该类型反应器的放大和规模化使用^[44]。

4.4 灌流式生物反应器

灌流式生物反应器(perfusion-based culture system)中的培养液不断的循环交换可大大提高反应器内

培养基成分的有效混合, 表现在增强的氧传递和营养物传质, 并及时有效地排除代谢废物。灌流培养可提高MSCs的克隆形成单位^[45]。这种反应器可同时培养多个细胞材料复合物, 将接种、操作和取样合为一个整体, 并且可以对细胞的周围环境包括pH值、温度、氧分压、代谢产物进行监测和控制。灌流反应器培养人源性MSCs, 在培养了40 d后, 细胞的数量达 4.22×10^7 并仍保持了向成骨、成脂方向分化的潜能^[46]。但不足之处是细胞的生长在此反应器的潜伏期较长, 20 d后才开始进入对数期。而且在这种培养方式下, 随着细胞数量的增加, 灌注阻力越来越大。此外, 不断地灌流也同时带走了细胞分泌的生长促进因子和分化抑制因子等, 对细胞的扩增不利。

总之, 以往传统上MSCs都是在有血清条件下进行贴壁培养和扩增, 即采用标准的2D(two-dimensional)培养模式。这类方法不易操作, 培养出的干细胞容易发生分化和变异, 重要的是细胞产量受到一定的限制。而生物反应器采用的3D(three-dimensional)培养模式, 在一定程度上解决了这些问题, 如表1所示。随着生物反应器培养体系的快速发展和完善, 势必有助于未来MSCs的大量扩增及促进其来源细胞产品向临床应用。

5 总结

综上所述, 虽然从多个方面人们已经了解到微环境的组成(因子、天然基质和仿生支架、理化信号、力学刺激等)对MSCs扩增的影响, 但将这些因子综合起来评价其干性扩增的功效的研究还相当有限, 主要原因是由于人们仍没有明确干细胞自我更新、分化的自身分子机制以及微环境的调控机理。此外, 当前MSCs的大规模培养和扩增还面临诸多挑战, 包括如何体外精确模拟干细胞微环境优化培养条件以及培养系统如何比拟放大等关键问题。国内外的一些研究进展揭示维持MSCs干细胞微环境, 包括一系列的生物、化学和物理信号, 细胞-细胞相互作用、细胞-基质相互作用、可溶性因子的生物学效应、氧含量、细胞外基质的特性(化学成分、软硬度、表面拓扑结构)及生物力学信号等可以一定程度上促进MSCs的扩增。但是, 所有的控制参数最优值还没有统一的结论, 最优化的扩增和培养条件的确定以及各类因素最佳的整合方式仍需做进一步

表1 静态(2D)和动态(3D)体系下培养和扩增MSCs的比较(根据参考文献[47]改编)

Table 1 Comparison of static and dynamic cell culture systems for MSCs expansion (modified from reference [47])

培养环境 Culture environment	反应器结构 Bioreactor configuration	产量 Ease of harvesting	操作性 Ease of monitoring	扩展性 Ease of scalability	传质 Mass transfer	剪切力 Shear stress	主要特征 Main characteristics
2D	Static culture system	+++	+	+	+	+	Spatial inhomogeneity, lack of non-invasive sampling, lack of automation and poor monitoring and control
3D	Rotary cell culture system	++	++	++	++	+	Homogeneous environment, reproducible, efficient gas transfer, lack of non-invasive sampling
	Stirred suspension culture system	+++	+++	+++	+++	+++	Homogeneous environment, reproducible, non-invasive sampling and shear stress limitations
	Hollow fiber membrane culture system	++	++	+	+	+	Homogeneous environment, reproducible, non-stabilized and uneven mass transfer
	Perfusion-based culture system	++	++	++	++	++	Homogeneous environment, enhanced mass transport, lack of non-invasive sampling

的研究^[48]。除了以上重要因素外,今后大规模培养和扩增MSCs还要考虑培养温度的控制、培养容器的改进、技术手段的优化,以及生物反应器中剪切力、传氧、传质等的影响,应整合和优化以上所有的这些因素来促进MSCs的高效扩增。

参考文献 (References)

- Elnakish MT, Hassan F, Dakhllallah D, Marsh CB, Alhaider IA, Khan M. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: Translation to bedside reality. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 646038.
- Hong IS, Kang KS. The effects of Hedgehog on the RNA-binding protein Msi1 in the proliferation and apoptosis of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013; 8(2): e56496.
- Xu J, Zhu C, Zhang Y, Jiang N, Li S, Su Z, *et al.* hE-cadherin-Fc fusion protein coated surface enhances the adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 109: 97-102.
- Mizukami A, Orellana MD, Caruso SR, Prata KdL, Covas DT, Swiech K. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells in a disposable fixed bed culture system. *Biotechnol Prog* 2013; 29: 568-72.
- Provin C, Takano K, Sakai Y, Fujii T, Shirakashi R. A method for the design of 3D scaffolds for high-density cell attachment and determination of optimum perfusion culture conditions. *J Biomech* 2008; 41(7): 1436-49.
- Da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 419-27.
- Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, *et al.* Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: Proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* 2006; 24(1): 23-33.
- Huang WT, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: A T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1512-8.
- Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, *et al.* HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: Inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 2005; 106(1): 59-66.
- Li D, Wang GY, Dong BH, Zhang YC, Wang YX, Sun BC. Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various Cytokines. *Cells Tissues Organs* 2007; 186(3):169-79.
- Quito FL, Beh J, Bashayan O, Basilico C, Basch RS. Effects of fibroblast growth factor-4 (k-FGF) on long-term cultures of human bone marrow cells. *Blood* 1996; 87(4): 1282-91.
- Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(3): 686-95.
- Valta MP, Hentunen T, Qu Q, Valve EM, Harjula A, Seppanen JA, *et al.* Regulation of osteoblast differentiation: A novel function for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology* 2006; 147(5): 2171-82.
- Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J. Effect of transforming growth factor beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2000; 61(9): 1003-10.
- Akino K, Mineta T, Fukui M, Fujii T, Akita S. Bone morphogenetic protein-2 regulates proliferation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen* 2003; 11(5): 354-60.
- Taira M, Nakao H, Takahashi J, Araki Y. Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Oral Rehabil* 2003; 30(7): 697-701.
- Carcamo-Orive I, Tejedano N, Delgado J, Gaztelumendi A, Otaegui

- D, Lang V, *et al.* ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp Cell Res* 2008; 314(8): 1777-88.
- 18 Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2007; 22(12): 1943-56.
- 19 Zangi L, Rivkin R, Kassis I, Levdansky L, Marx G, Gorodetsky R. High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads. *Tissue Eng* 2006; 12(8): 2343-54.
- 20 Lai Y, Sun Y, Skinner CM, Son EL, Lu Z, Tuan RS, *et al.* Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix *ex vivo*: A robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19(7): 1095-107.
- 21 Mauck RL, Baker BM, Nerurkar NL, Burdick JA, Li WJ, Tuan RS, *et al.* Engineering on the straight and narrow: the mechanics of nanofibrous assemblies for fiber-reinforced tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15(2): 171-93.
- 22 Li WJ, Laurencin CT, Cateson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(4): 613-21.
- 23 Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(13): 1989-2006.
- 24 Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005; 6(5): 2583-9.
- 25 Yin Z, Chen X, Chen JL, Shen WL, Hieu Nguyen TM, Gao L, *et al.* The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* 2010; 31(8): 2163-75.
- 26 Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(12): 1033-42.
- 27 Gauthaman K, Venugopal JR, Yee FC, Peh G, Ramakrishna S, Bongso A. Nanofibrous substrates support colony formation and maintain stemness of human embryonic stem cells. *J Cell Mol Med* 2009; 13(9B): 3475-84.
- 28 Ma K, Chan CK, Liao S, Hwang WY, Feng Q, Ramakrishna S. Electrospun nanofiber scaffolds for rapid and rich capture of bone marrow-derived hematopoietic stem cells. *Biomaterials* 2008; 29(13): 2096-103.
- 29 Zhong S, Zhang Y, Lim CT. Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: A review. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(2): 77-87.
- 30 Iwasa J, Ochi M, Uchio Y, Katsube K, Adachi N, Kawasaki K. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artif Organs* 2003; 27(3): 249-55.
- 31 Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(2): 644-52.
- 32 Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006; 207(2): 331-9.
- 33 Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(3): 948-53.
- 34 Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2363-70.
- 35 Liu CH, Wu ML, Hwang SM. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 2007; 33(1): 1-9.
- 36 Kinzebach S, Bieback K. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions. *Adv biochem Eng Biot* 2013; 129: 33-57.
- 37 Brunner D, Frank J, Appl H, Schoeffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 2010; 27: 53-62.
- 38 Winer JP, Janmey PA, McCormick ME, Funaki M. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(1): 147-54.
- 39 杨忠财, 邱明宁, 刘红亮, 刘军, 权富生, 张涌. 生物反应器在干细胞培养中的应用研究进展. *中国细胞生物学学报* (Yang Zhongcai, Qiu Mingning, Liu Hongliang, Liu Jun, Quan Fusheng, Zhang Yong. Stem cells cultivation research progress in bioreactors. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(3): 374-80.
- 40 Tavakoli T, Xu X, Derby E, Serebryakova Y, Reid Y, Rao MS, *et al.* Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines 13, 16 and BG01V. *BMC Cell Biol* 2009; 10: 44-59.
- 41 Huang NF, Niiyama H, De A, Gambhir SS, Cooke JP. Embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of hindlimb ischemia. *J Vis Exp* 2009; (23): 1034.
- 42 Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(9): 2052-9.
- 43 Jackson LR, Trudel LJ, Fox JG, Lipman NS. Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production. *J Immunol Methods* 1996; 189(2): 217-31.
- 44 Gramer MJ, Poeschl DM. Comparison of cell growth in T-flasks, in micro hollow fiber bioreactors, and in an industrial scale hollow fiber bioreactor system. *Cytotechnology* 2000; 34(1/2): 111-9.
- 45 Braccini A, Wendt D, Jaquiere C, Jakob M, Heberer M, Kenins L, *et al.* Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells* 2005; 23(8): 1066-72.
- 46 Zhao F, Ma T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91(4): 482-93.
- 47 Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13: 673-91.
- 48 Fernandez Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* 2013; 85: 1-10.