

三维培养技术在间充质干细胞临床转化应用中的研究进展

冯春 李俊良 李鹏飞 裴娟 蔡泓志*

(昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源于发育早期中胚层, 具有多向分化潜能, 已广泛应用于科学研究和临床前试验, 且在多种疾病的治疗研究中展现出一定的安全性和有效性, 具有广阔的应用前景。由于传统单层细胞培养方式无法长期保持MSCs的生物学特性, 因此基于细胞球、中空纤维、生物支架和微载体等的三维培养技术逐渐应用于MSCs的科学研究和临床前试验。该文通过阐述三维培养MSCs的优点和三维培养的MSCs在疾病治疗中的进展, 探索三维培养的MSCs在科学研究和临床应用中的前景。

关键词 间充质干细胞; 三维培养; 规模化培养; 细胞治疗

Research Progress of Three-Dimensional Culture Technology in Clinical Transformation of Mesenchymal Stem Cells

FENG Chun, LI Junliang, LI Pengfei, PEI Juan, CAI Hongzhi*

(Institute of Primate Translational Medicine, Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract MSCs (mesenchymal stem cells) are derived from the early development of mesoderm, and have the potential of multi-directional differentiation. They have been widely used in scientific research and preclinical trials, and show safety and effectiveness in the treatment of a variety of diseases. MSCs have broad application prospects. Because the traditional monolayer cell culture method cannot maintain the biological characteristics of MSCs for a long time, the 3D (three-dimensional) culture technology based on cell spheres, hollow fibers, biological scaffolds and microcarriers has been gradually applied to the scientific research and preclinical trials of MSCs. This paper explores the future of 3D MSCs in scientific research and clinical application by expounding the advantages of 3D MSCs and the progress of 3D MSCs in disease treatment.

Keywords mesenchymal stem cells; three-dimensional culture; large-scale culture; cell therapy

随着生物医疗技术的发展, 生物治疗为疾病治疗提供了新的选择, 其中干细胞治疗受到医护工作者和科研人员高度关注, 逐渐成为新医学的重要研究方向^[1]。干细胞的增殖和分化特性, 使其具备修

复组织器官损伤的功能。在疾病治疗及组织工程中, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)具有巨大潜力, 可用于多种疾病的治疗, 其中ESCs和iPSCs

收稿日期: 2020-12-23

接受日期: 2020-04-22

国家自然科学基金(批准号: 31760268)和中国博士后基金(批准号: 2020M673592XB)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65952872, E-mail: chenshertrai@163.com

Received: December 23, 2020

Accepted: April 22, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31760268) and China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2020M673592XB)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65952872, E-mail: chenshertrai@163.com

分化的功能细胞在安全性方面显著改善, 如利用iPSCs分化的巨核细胞, 改进培养方式能增加血小板得率, 可获得临床应用数量级的人造血小板^[2]。然而, ESCs和iPSCs的应用存在致瘤的风险^[3-4], 且来源仍存在伦理争议, 在一定程度上限制了ESCs和iPSCs的临床应用^[5]。

相较而言, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)属于成体干细胞, 虽然其全能性较弱, 但临床应用的安全性较高, 同时具备免疫调节、损伤修复、自我更新和分化成多种类型细胞的能力, 且MSCs的来源广泛, 取材方便, 面临的伦理争议较小^[6]。因此, MSCs具有广泛的临床应用价值^[7]。早期MSCs作用机制研究得不透彻, 限制了MSCs的应用, 但近年MSCs治疗疾病机制的研究逐渐成为了重点^[8], 促使MSCs在多种疾病治疗的临床前研究中取得了突破性进展, 且部分成果逐渐应用于临床治疗^[9], 促进了MSCs的临床转化。

MSCs是机体的储备细胞, 分布广泛, 但由于自体MSCs在组织中含量极低^[10], 因此其能发挥组织修复的作用有限。多项研究显示, 体外分离培养扩增的MSCs, 无论自体或异体移植都能发挥抑制炎症、重组免疫细胞、维持免疫稳态和激活组织内源性修复等作用以改善疾病^[11-12], 并且人们在多种科学研究和临床前试验中均检测到明显的治疗效果^[13-14], 这可能与移植的MSCs数量庞大有关^[15], 且体外培养过程可能改变MSCs的某些特性, 使其移植后能更好地发挥治疗功能^[16]。因此, 无论是科学研究还是临床应用, 都需要MSCs的规模化培养。

MSCs规模化培养的探索从未停止, 传统的单层培养方式虽然能有效地扩增MSCs, 但单层培养始终无法长期保持MSCs原有的细胞特性^[17], 因此, MSCs三维培养技术逐渐进入研究者的视野。研究表明, 三维培养相比于单层培养能较好地支持MSCs增殖, 构建细胞生长微环境, 增强细胞分泌能力, 使MSCs具有更好的生物学特性, 以及治疗效果^[18]。无论是成球或基于生物材料三维培养的MSCs均能促进血管生成因子、生长因子和抗炎因子的分泌, 从而增强MSCs的再生能力、分化潜能和免疫调节功能^[19-20]。

1 MSCs的来源和特点

1.1 MSCs的来源

MSCs可从骨髓、脐带、脐带血、脂肪、胎盘、

牙髓、滑液等多种组织中分离(图1A), 甚至可分离于流产胎儿的肝和肺^[21-22]。由于道德、伦理、法律和取材难度等因素的限制, 流产胎儿肝脏、肺和机体骨髓来源MSCs的研究和应用受限。而脐带、脐带血、脂肪和胎盘等组织来源的MSCs更容易安全分离和体外培养, 尤其是人脐带组织来源的MSCs。脐带、脐带血、脂肪和胎盘等组织来源的MSCs因其有容易分离培养、伦理争议较小和分离细胞纯度高优点, 逐渐成为备受瞩目的研究对象^[23]。

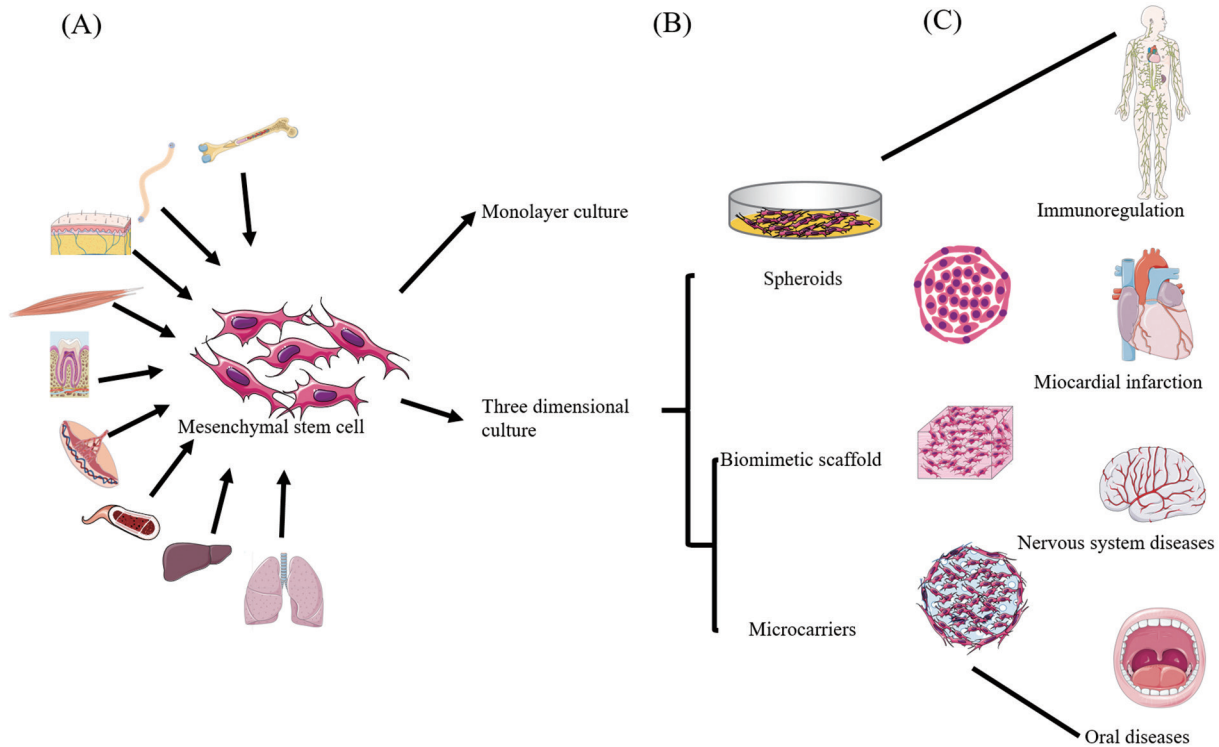
1.2 不同来源MSCs的特性

MSCs是一种最初在骨髓基质中被发现的非造血干细胞^[24]。随着科学研究的不断深入, 发现多种人体组织器官中均含有MSCs。不同组织来源的MSCs性质相似, 均表达CD44、CD73、CD90、CD105, 不表达CD45、CD34、HLA-DR, 具备多向分化潜力, 亦存在组织来源差异^[25]。肌肉和脂肪组织源性MSCs的增殖能力相比于其他组织源性的MSCs较弱, 滑膜源性MSCs的增殖能力强于骨髓源性的MSCs^[26]。虽然体外培养方式可能影响MSCs的分化能力, 但在成软骨的分化潜能方面, 脐带、骨髓、滑膜和骨膜源性MSCs比脂肪组织或肌肉源性MSCs具有更强的软骨形成潜能, 特别是滑膜源性MSCs表现出软骨发育优势^[27]。在脂肪细胞分化能力方面, 脂肪源性MSCs分化能力显著优于其他组织来源的MSCs^[28]。相比于骨髓源性MSCs, 脐带源性MSCs自我更新速度比骨髓MSCs快, 通过体外扩增培养, 可获得更多优质MSCs^[29], 预示脐带源性MSCs增殖能力和多能性更强。此外, 脐带源性MSCs能表达多种有效的免疫调节因子, 如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等, 其免疫调节能力高于其他组织来源的MSCs^[30]。

2 MSCs的三维培养

2.1 培养类型

MSCs的三维培养主要通过细胞间聚集或细胞与生物材料间的黏附实现(图1B)。(1) 无生物材料支撑的MSCs三维培养主要通过空间限制或是重力影响等方式将细胞局限在有限空间, 增加细胞间接触, 使细胞依靠它们之间的黏附分子聚集成球, 以细



A: 间充质干细胞的来源; B: 间充质干细胞的培养方式; C: 间充质干细胞的疾病治疗。

A: sources of mesenchymal stem cells; B: culture methods of mesenchymal stem cells; C: diseases treatment of mesenchymal stem cells.

图1 间充质干细胞培养与临床应用

Fig.1 Culture and clinical application of mesenchymal stem cells

胞球的形式进行培养^[31]。这种类型的三维培养可通过悬滴法、液滴法、低吸附培养板法、凹型孔板法等多种方式实现^[32]。虽然上述方法可较为精确地控制细胞球体大小,但由于工作量较大、成本高,仅适用于科学研究,难以实现规模化培养和临床转化^[33]。此外,采用细胞搅拌器培养MSCs,剥夺MSCs贴壁条件,使MSCs自发聚集形成细胞球,虽然这种优化的培养方式可减少工作量,增加三维细胞球获取量,但细胞球大小差异明显,且较多散在单细胞游离于培养基中缓慢凋亡,影响成球细胞的生长状态^[34]。(2) 三维培养生物支架多为水凝胶支架,由亲水性聚合物、共聚物或单体大分子交联获得,多种可选择材料确保了支架的生物相容性。同时,可添加生物活性因子促进细胞增殖和分泌以改善治疗效果,但由于其特殊的结构特性,不利于规模化制备和细胞培养。因此,基于生物支架的MSCs的三维培养技术多应用于MSCs分泌功能和组织损伤修复的研究^[35]。(3) 随着生物材料研究的发展,生物材料制备的微载体可应用于MSCs的三维培养^[20]。目前,微载体的类型多种多样,根据使用材料的不同可分为多糖类、

纤维素类、蛋白质类和高分子合成材料等^[36],如按照微载体结构可分为实心微载体和多孔微载体。多孔微载体具有更大的生长空间,不仅为MSCs的生长提供支撑条件,促进MSCs的黏附和触脚延伸,保障内部细胞生长所需的物质交换,还可有效模拟细胞体内生长的微环境,增强细胞抗性,弥补常规球形三维培养所面临的诸多缺陷^[37-38],如减少搅拌剪切力对细胞造成的损伤和避免物质交换障碍而导致球体内部细胞逐渐凋亡^[39],使最终收获细胞量大幅提高的同时,维持细胞活力。因此,基于多孔微载体的MSCs三维培养已成为当前MSCs研究的热点之一。

2.2 三维培养优势

近年来,诸多研究结果显示,MSCs在免疫调控、损伤修复、器官功能改善以及退行性疾病治疗中均有巨大的治疗潜力,探究MSCs在不同疾病进程中的治疗应用仍然是MSCs研究的热点。临床应用需要数量庞大的MSCs^[40],是单层细胞培养不可逾越的障碍。随着三维培养技术的推广和应用,可实现MSCs的规模化扩增,以应用于细胞移植和组织修复工程^[41]。微载体结合生物反应器扩增MSCs易于

扩大培养,操作模式灵活利于监测和控制培养过程,在提高培养效率的同时能较好地维持细胞的一致性,且可有效降低生产成本^[42]。进一步的研究表明,三维培养的MSCs在免疫调节、血管生成、损伤修复以及组织器官功能改善等方面显示出较好的治疗效果^[43],三维培养的MSCs不仅能增强细胞干性,也能提高MSCs移植后的成活率^[44]。基于微载体三维培养的MSCs可避免消化传代等操作,即通过添加新的微载体和更换新鲜培养基的方式扩大培养规模,使用少量培养基即可获得大量的优质细胞^[45]。此外,由于三维培养能模拟细胞在体内的生长环境,不仅能促进MSCs的谱系分化^[46],降低营养需求^[47],还能增强细胞的分泌能力^[48-49]。其中,结合生物支架培养的MSCs,虽然不适用于规模化扩增,但其出色的组织相容性,有效加快了组织修复进程^[50-51]。

2.3 三维培养条件中MSCs的特性变化

三维球状培养导致MSCs的微环境发生明显变化,MSCs通过细胞外基质、整合素和钙黏蛋白聚集成细胞球,在收缩力和皮质张力的作用下,球体内部细胞受到挤压,细胞骨架发生重排,导致细胞尺寸变小,细胞质致密,细胞核体积减小,而表层细胞在张力作用下被拉伸,细胞变得细长,同时,钙黏蛋白以及细胞外基质表达上升。由于球体较为松散,培养早期的细胞增殖速度加快,中后期细胞排列密集导致生长空间受限,细胞增殖逐渐减少, G_0/G_1 细胞周期发生阻滞,细胞外基质的分泌提高,旁分泌机制的保护作用使细胞抗氧化和抗应激能力得到增强^[32,52]。伴随上述特性的改变,三维培养的MSCs对能量的需求降低,趋化因子基因*CXCR-4*、*CLC-12*表达上调,细胞迁移能力增强^[53]。同时*Oct-4*、*Sox2*、*Nanog*、*c-myc*和*Klf-4*等多能性基因表达水平升高^[54]。诱导成骨^[55]、软骨^[56]、成脂分化^[20]时,无论是基于细胞球、水凝胶生物支架或是微载体三维培养的MSCs均具有更好的分化特性^[57],表明在三维培养状态下MSCs的多能性和分化潜能得到提高。由于细胞生长微环境的改变,三维培养的MSCs细胞因子的分泌增加,治疗潜力也得到激发^[58-59]。

3 三维培养的MSCs在科学研究和疾病治疗中的应用

3.1 三维培养的MSCs增强免疫调节功能

研究显示MSCs能改善人体多种疾病,包括免

疫疾病、软骨损伤、神经系统疾病以及多种损伤导致的炎症等(图1C),其中MSCs较早被人们所认知的功能是抗炎和免疫调控,目前免疫调控仍然是MSCs在临床应用中被认可的重要功能之一。MSCs移植可以减少炎症组织释放TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 等因子,从而减轻炎症对机体造成深层次的损伤。研究显示,三维培养使MSCs分泌的免疫调节因子水平明显上调,相比于单层培养的MSCs,三维培养MSCs来源的培养基上清抑制外周血单核细胞增殖的作用更明显^[60]。FOLLIN等^[61]证实,细胞球形态和结合不同材料三维培养的MSCs相比于传统单层培养分泌更多的免疫调节因子,包括PGE2、HGF、TSG-6、MCP-1、IL-6、IDO、TGF- β 1等,因此显示出更强的免疫调控能力。在炎症疾病动物模型治疗中,三维培养的MSCs也显示出了明显的炎症抑制作用,BARTOSH等^[33]研究发现,成球培养的MSCs刺激IDO、TSG-6高表达,在脂多糖激活的巨噬细胞共培养以及腹膜炎小鼠模型中显示出了比单层培养MSCs更强的炎症抑制功能。上述研究显示,三维培养的MSCs免疫调控能力的增强,可能是通过促进免疫调节因子的分泌而实现的。

3.2 三维培养的MSCs增强口腔上皮修复功能

口腔黏膜疾病是多种免疫性疾病的并发症,亦是癌症放射治疗后严重的副作用之一。严重的口腔黏膜疾病不仅影响患者生活质量,而且会影响其他疾病的治疗效果。MSCs对口腔黏膜疾病所产生的炎症反应有良好的治疗效果。SCHMIDT等^[62]研究显示,单层培养的MSCs消化后以细胞悬液的形式进行移植改善了辐射诱导的口腔黏膜炎症,使黏膜的功能得到了恢复。MARIA等^[63]发现,脂肪来源的MSCs缩短了口腔黏膜溃疡的持续时间,减小了溃疡面积,增加了溃疡底部上皮的厚度。但单层培养的MSCs以细胞悬液的形式进行移植后存活率较低,也难以在病变部位累积,治疗效果有待提高。ZHANG等^[64]揭示以移植三维培养的MSCs细胞球修复受损口腔黏膜的方法,研究结果显示,相比于单层贴壁培养,三维培养的MSCs多能性基因*Oct-4*、*Nanog*表达水平明显增高,虽然细胞球状态下培养的MSCs细胞增殖空间受限,但MCP-1/2/3、M-CSF、VEGF、Angiogenin、IL-6等因子分泌功能增强,移植后口腔黏膜修复效果显著优于单层培养。由于口腔黏膜组织的特殊性,MSCs口腔移植治疗后细胞存活问题一

直是MSCs口腔治疗应用中亟待解决的难题,上述研究证实移植三维培养的MSCs细胞球不仅可以缓解移植后细胞生长微环境剧烈变化的问题,提高移植后细胞的存活率,而且MSCs细胞球还可能通过增加损伤修复因子的分泌,使修复效果得以改善。

3.3 三维培养MSCs源性的外泌体用于疾病治疗

外泌体是一种直径为30~150 nm的微小囊泡,可作为药物递送的载体,携带糖类、蛋白质、脂质、核糖核酸等功能性物质并在细胞间传递,该传递过程是一种细胞间的通讯方式。MSCs源性的外泌体具有MSCs免疫调节、损伤修复等多种功能特性。MSCs的培养方式影响其外泌体的特性和数量。YAN等^[65]研究发现,利用中空纤维培养MSCs产生外泌体的数量较多,其刺激软骨细胞增殖、迁移、基质合成和抑制细胞凋亡的作用优于单层培养MSCs源性外泌体,具有更好的软骨损伤修复能力。HARASZTI等^[66]报道了微载体三维培养MSCs的外泌体的分泌量是普通单层培养的20倍以上,后续蛋白质组学分析显示,微载体三维培养MSCs收获的外泌体的功能特性蛋白纯度高于单层培养的MSCs。表明微载体三维培养MSCs产生的外泌体数量较多、纯度较高,有利于后续的科学研究和临床应用。进一步的研究证实,基于亨廷顿病的动物模型,微载体三维培养MSCs收获的外泌体与干扰RNA共孵育可展现出更好的治疗效果,说明微载体三维培养MSCs收获的外泌体药物递送功能较优越,能有效地将干扰RNA递送给神经元,以发挥疾病治疗作用。虽然外泌体被证实是优良的药物递送载体,但由于传统的单层细胞培养无法提高外泌体的产量而使外泌体的应用屡屡受限,他们的工作还表明,三维微载体培养的MSCs显著提高外泌体的产量并增强外泌体的载体功能特性,使获取的外泌体利于后续的科学研究和临床应用,为MSCs的无细胞治疗奠定了研究基础。

3.4 三维培养的MSCs促进心肌梗死的治疗

心肌梗死是常见的心脏疾病之一,MSCs移植被认为是一种治疗心肌梗死的有效方法。AMADO等^[67]研究发现,移植异体骨髓源性MSCs悬液使心肌梗死的动物模型梗死面积显著减少,心功能得到较大程度恢复。由于心脏处于持续跳动状态,将MSCs消化成单细胞悬液进行移植,移植细胞难以在病变部位稳定存在,因此,残存的MSCs会因微环境的改变而逐渐死亡,治疗效果并不理想。以细胞球形式或与生物

支架共培养MSCs,可稳定构建细胞生长微环境,为MSCs心脏移植提供了新选择。CHEN等^[68]研究发现,将脂肪来源的MSCs与转谷氨酰胺酶交联的明胶共培养后进行移植,增加了MSCs的存活率,提高了MSCs迁移能力,延长了MSCs在注射部位的存活时间,显著改善了缺血性心脏病的治疗效果。LEE等^[69]证实,移植成球培养的MSCs促进心肌梗死修复,其研究表明,成球培养的MSCs移植相比于MSCs悬液注射治疗,移植区域可检测到较多MSCs,这解决了移植后细胞快速流失的问题。由于成球培养的MSCs钙黏蛋白的表达水平升高,移植后可显著改善心室收缩力,减弱心肌纤维化程度,增加病变区域的毛细血管,表明三维培养的MSCs能较好地促进心肌梗死区域的修复。以上研究证实,采用MSCs细胞球或生物支架共培养的MSCs等空间结构相对稳定的细胞移植治疗,能为移植细胞提供较为稳定的局部生长微环境,减少细胞流失,使心脏功能的恢复效果更显著。

3.5 三维培养MSCs促进骨损伤修复

MSCs通过分泌多种细胞因子、生长因子以及骨分化等方式促进损伤组织修复,然而以细胞悬液的形式进行细胞移植时存在细胞容易流失等问题。可以根据损伤组织的特性选择交联材料作为水凝胶生物支架,并在此基础上添加合适的活性因子制作特异的水凝胶生物支架,然后将其与MSCs共培养并进行移植,这为MSCs提供了较为合适的黏附和存活条件,并减少了细胞的流失,同时增加了MSCs的骨分化能力,从而增强了MSCs的骨修复作用。JI等^[70]将MSCs包裹到新型温敏PCL/nHA+HPCH水凝胶中,包裹对MSCs的存活和增殖无明显影响,但成骨分化过程中OCN、OPN、Runx1、Runx2、Runx3等成骨分化相关基因表达水平明显上升,成骨能力得到增强。同时,移植该材料包裹的MSCs通过旁分泌刺激巨噬细胞分泌血管生成和骨诱导生长因子表达,为血管化和成骨创造良好的微环境。移植9周后,CT结果显示,包裹MSCs的新型水凝胶支架的新骨体积相比于其他实验组显著增加,H&E和Masson染色显示该组具有更多的再生骨。JIA等^[71]通过可注射的壳聚糖基水凝胶包裹兔滑液源性的MSCs治疗兔股骨髁骨沟的软骨缺失。研究显示,制备的水凝胶促进了MSCs的软骨分化,移植后损伤处新生软骨组织细胞外基质沉积更显著,且具备更好的机械性能。

上述的研究证实,组织相容性生物材料不仅为

MSCs提供合适的黏附和生长环境, 提高MSCs分泌、分化能力, 也增强细胞治疗的损伤修复作用, 预示将具备疾病治疗功能的生物材料与MSCs共培养后再进行移植能大幅提高疾病治疗效果。

4 结论与展望

MSCs具有免疫调控、损伤归巢、招募修复因子、促进损伤修复、为其他细胞提供营养支持和可用于异体移植等特性^[20], 在细胞治疗中具有广阔应用前景。无论是科学研究、临床前试验或是转化应用, 都需要实现MSCs的规模化培养。细胞工厂、细胞球、中空纤维、生物支架和微载体等新型培养技术逐渐应用于MSCs的体外培养, 很大程度提高了MSCs的产量。虽然不同培养方式获得的MSCs在分泌、分化、免疫调节和损伤修复等方面存在差异, 但都具有独特的应用优势和特点。球型培养的MSCs在定点移植时能维持细胞球原有微环境, 提高细胞存活率, 并有效降低移植后细胞流失数量; 生物支架和中空纤维多用于研究MSCs增殖、分化、培养条件变化和空间结构改变等对细胞的影响; 微载体三维培养则有利于规模化生产MSCs, 在维持细胞多能性的同时, 增强MSCs的分泌能力并激发疾病治疗潜力。生物材料的联合应用不仅促进了MSCs规模化培养的进程, 而且明显增强了MSCs的治疗效果, 极大促进了MSCs产业化和生物材料结合应用研究的繁荣发展。

材料学和生命科学的结合发展, 使生物材料逐渐成为研究热点, 生物材料与细胞的结合应用将是细胞治疗未来发展的重点。随着技术的突破和创新, 生物材料通过生物打印形成结构和形态特异的载体或支架, 可根据治疗需求、组织的特异性和细胞的类型, 添加生物因子改善治疗细胞的生长状态并增强治疗效果, 以达到疾病定制化修复和治疗的效果。除此之外, 与生物材料结合的干细胞三维培养技术甚至能应用于体外类器官形成的研究, 这不断加快了人造器官发展的脚步, 不仅是干细胞研究领域新的机遇和挑战, 也是无数科研工作者努力的方向。

参考文献 (References)

[1] ZAKRZEWSKI W, DOBRZYNSKI M, SZYMONOWICZ M, et al. Stem cells: past, present, and future [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 68.

[2] ITO Y, NAKAMURA S, SUGIMOTO N, et al. Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale *ex vivo* production [J]. Cell, 2018, 174(3): 636-48, e18.

[3] PROTZE S I, LEE J H, KELLER G M. Human pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells: from developmental biology to therapeutic applications [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(3): 311-27.

[4] DU J, XU Y, SASADA S, et al. Signaling inhibitors accelerate the conversion of mouse iPS cells into cancer stem cells in the tumor microenvironment [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9955.

[5] DESGRES M, MENASCHE P. Clinical translation of pluripotent stem cell therapies: challenges and considerations [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(5): 594-606.

[6] DING D C, SHYU W C, LIN S Z. Mesenchymal stem cells [J]. Cell Transplant, 2011, 20(1): 5-14.

[7] LI J Y, REN K K, ZHANG W J, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 247.

[8] XIA X, CHAN K F, WONG G T Y, et al. Mesenchymal stem cells promote healing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-related peptic ulcer through paracrine actions in pigs [J]. Sci Trans Med, 2019, 11(516): eaat7455.

[9] HAN Y, LI X, ZHANG Y, et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. Cells, 2019, 8(8): 886.

[10] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-7.

[11] MAXSON S, LOPEZ E A, YOO D, et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(2): 142-9.

[12] HU C, LI L. The immunoregulation of mesenchymal stem cells plays a critical role in improving the prognosis of liver transplantation [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 412.

[13] TAKETANI T. Clinical application of mesenchymal stem cells for hematological diseases [J]. Rinsho Ketsueki, 2018, 59(10): 2362-72.

[14] ROGERS C J, HARMAN R J, BUNNELL B A, et al. Rationale for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells for COVID-19 patients [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 203.

[15] ZHOU B O, YUE R, MURPHY M M, et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(2): 154-68.

[16] SHI Y, WANG Y, LI Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 493-507.

[17] NITTA S, HISASUE M, HORIGUCHI Y, et al. Three-dimensional spheroid culture of canine hepatocyte-like cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Regen Ther, 2020, 15: 210-5.

[18] RUBÍ-SANS G, RECHA-SANCHO L, PÉREZ-AMODIO S, et al. Development of a three-dimensional bioengineered platform for articular cartilage regeneration [J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 52.

[19] CHENG R J, XIONG A J, LI Y H, et al. Mesenchymal stem cells: allogeneic MSC may be immunosuppressive but autologous

- MSC are dysfunctional in lupus patients [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 285.
- [20] KOH B, SULAIMAN N, FAUZI M B, et al. Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: a systematic review [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 75.
- [21] HUANG B, QIAN C, DING C, et al. Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 362.
- [22] MÖBIUS M A, FREUND D, VADIVEL A, et al. Oxygen disrupts human fetal lung mesenchymal cells. Implications for bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(5): 592-600.
- [23] BOUGIOUKLI S, SAITTA B, SUGIYAMA O, et al. Lentiviral gene therapy for bone repair using human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(7): 906-17.
- [24] GREGORY C A, PROCKOP D J, SPEES J L. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(2): 330-5.
- [25] LU H, WANG F, MEI H, et al. Human adipose mesenchymal stem cells show more efficient angiogenesis promotion on endothelial colony-forming cells than umbilical cord and endometrium [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7537589.
- [26] SAKAGUCHI Y, SEKIYA I, YAGISHITA K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(8): 2521-9.
- [27] WU K H, ZHOU B, LU S H, et al. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(3): 608-16.
- [28] HUIBREGTSE B A, JOHNSTONE B, GOLDBERG V M, et al. Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells [J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(1): 18-24.
- [29] SARUGASER R, LICKORISH D, BAKSH D, et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(2): 220-9.
- [30] RAD F, GHORBANI M, MOHAMMADI ROUSHANDEH A, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for autoimmune diseases: emerging roles of extracellular vesicles [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(1): 1533-49.
- [31] RYU N E, LEE S H, PARK H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1620.
- [32] SART S, TSAI A C, LI Y, et al. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(5): 365-80.
- [33] BARTOSH T J, YLOSTALO J H, MOHAMMADIPOOR A, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31): 13724-9.
- [34] HILDEBRANDT C, BÜTH H, THIELECKE H. A scaffold-free *in vitro* model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Cell*, 2011, 43(2): 91-100.
- [35] SORIANO-RUIZ J, GÁLVEZ P, LÓPEZ RUIZ E, et al. Design and evaluation of mesenchymal stem cells seeded chitosan/glycosaminoglycans quaternary hydrogel scaffolds for wound healing applications [J]. *Int J Pharm*, 2019, 570(118632): 5173.
- [36] TAVASSOLI H, ALHOSSEINI S N, TAY A, et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products [J]. *Biomaterials*, 2018, 181: 333-46.
- [37] NGUYEN L, BANG S, NOH I. Tissue regeneration of human mesenchymal stem cells on porous gelatin micro-carriers by long-term dynamic *in vitro* culture [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(1): 19-28.
- [38] YAN X, ZHANG K, YANG Y, et al. Dispersible and dissolvable porous microcarrier tablets enable efficient large-scale human mesenchymal stem cell expansion [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2020, 26(5): 263-75.
- [39] YEKRANGSAFAKAR A, ACUN A, CHOI J W, et al. Hollow microcarriers for large-scale expansion of anchorage-dependent cells in a stirred bioreactor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(7): 1717-28.
- [40] SATIJA N K, SINGH V K, VERMA Y K, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(11/12): 4385-402.
- [41] SANTOS F, ANDRADE P Z, ABECASIS M M, et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(12): 1201-10.
- [42] SILVA COUTO P, ROTONDI M C, BERSENEV A, et al. Expansion of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) in bioreactors using microcarriers: lessons learnt and what the future holds [J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 45: 107636.
- [43] KOUROUPIS D, CORREA D. Increased mesenchymal stem cell functionalization in three-dimensional manufacturing settings for enhanced therapeutic applications [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 621748.
- [44] TSAI A C, JESKE R, CHEN X, et al. Influence of microenvironment on mesenchymal stem cell therapeutic potency: from planar culture to microcarriers [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 640.
- [45] MALDA J, FRONDOZA C G. Microcarriers in the engineering of cartilage and bone [J]. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(7): 299-304.
- [46] PARK M J, LEE J, BYEON J S, et al. Effects of three-dimensional spheroid culture on equine mesenchymal stem cell plasticity [J]. *Vet Res Commun*, 2018, 42(3): 171-81.
- [47] LYNCH M, MARINOV G K. The bioenergetic costs of a gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(51): 15690-5.
- [48] KIM M, YUN H W, PARK D Y, et al. Three-dimensional spheroid culture increases exosome secretion from mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 15(4): 427-36.
- [49] REDONDO-CASTRO E, CUNNINGHAM C J, MILLER J, et al. Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human mesenchymal stem cells *in vitro* by interleukin-1 priming [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 11.
- [50] SALINAS C N, ANSETH K S. Mesenchymal stem cells for craniofacial tissue regeneration: designing hydrogel delivery vehicles [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(8): 681-92.

- [51] SORIANO-RUIZ J L, GÁLVEZ-MARTÍN P, LÓPEZ-RUIZ E, et al. Design and evaluation of mesenchymal stem cells seeded chitosan/glycosaminoglycans quaternary hydrogel scaffolds for wound healing applications [J]. *Int J Pharm*, 2019, 570(5173): 118632.
- [52] JAUKOVIĆ A, ABADJIEVA D, TRIVANOVIĆ D, et al. Specificity of 3D MSC spheroids microenvironment: impact on MSC behavior and properties [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(5): 853-75.
- [53] TSAI A C, LIU Y, YUAN X, et al. Aggregation kinetics of human mesenchymal stem cells under wave motion [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12(5): 1600448.
- [54] QIAO Y, XU Z, YU Y, et al. Single cell derived spheres of umbilical cord mesenchymal stem cells enhance cell stemness properties, survival ability and therapeutic potential on liver failure [J]. *Biomaterials*, 2020, 227: 119573.
- [55] ZHENG G, XIE Z, WANG P, et al. Enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in ankylosing spondylitis: a study based on a three-dimensional biomimetic environment [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 350.
- [56] SALONIUS E, KONTTURI L, LAITINEN A, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a three-dimensional environment [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3497-507.
- [57] SUN L Y, HSIEH D K, SYU W S, et al. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances *in vitro* differentiation potential [J]. *Cell Prolif*, 2010, 43(5): 445-56.
- [58] PETRENKO Y, SYKOVÁ E, KUBINOVÁ Š. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 94.
- [59] KIM H J, SUNG I Y, CHO Y C, et al. Three-dimensional spheroid formation of cryopreserved human dental follicle-derived stem cells enhances pluripotency and osteogenic induction properties [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(5): 513-23.
- [60] MICELI V, PAMPALONE M, VELLA S, et al. Comparison of immunosuppressive and angiogenic properties of human amnion-derived mesenchymal stem cells between 2D and 3D culture systems [J]. *Stem Cells International*, 2019, 2019: 7486279.
- [61] FOLLIN B, JUHL M, COHEN S, et al. Increased paracrine immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016, 322-9.
- [62] SCHMIDT M, HAAGEN J, NOACK R, et al. Effects of bone marrow or mesenchymal stem cell transplantation on oral mucositis (mouse) induced by fractionated irradiation [J]. *Strahlenther Onkol*, 2014, 190(4): 399-404.
- [63] MARIA O M, SHALABY M, SYME A, et al. Adipose mesenchymal stromal cells minimize and repair radiation-induced oral mucositis [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(9): 1129-45.
- [64] ZHANG Q, NGUYEN A L, SHI S, et al. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(6): 937-47.
- [65] YAN L, WU X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(2): 165-78.
- [66] HARASZTI R A, MILLER R, STOPPATO M, et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2838-47.
- [67] AMADO L C, SALIARIS A P, SCHULERI K H, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11474-9.
- [68] CHEN Y, LI C, LI C, et al. Tailorable hydrogel improves retention and cardioprotection of intramyocardial transplanted mesenchymal stem cells for the treatment of acute myocardial infarction in mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(2): e013784.
- [69] LEE E J, PARK S J, KANG S K, et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(7): 1424-33.
- [70] JI X, YUAN X, MA L, et al. Mesenchymal stem cell-loaded thermosensitive hydroxypropyl chitin hydrogel combined with a three-dimensional-printed poly(ϵ -caprolactone)/nano-hydroxyapatite scaffold to repair bone defects via osteogenesis, angiogenesis and immunomodulation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(2): 725-40.
- [71] JIA Z, ZHU F, LI X, et al. Repair of osteochondral defects using injectable chitosan-based hydrogel encapsulated synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 99: 541-51.