

利用微载体悬浮培养人脐带间充质干细胞

李夏^{1,2,3}, 滑慧娟^{2,3}, 郝捷^{2,3}, 王柳^{2,3}, 刘忠华¹

1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

2. 北京干细胞库, 北京 100190

3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101

摘要: 随着干细胞研究的不断深入, 干细胞功能分化研究和临床应用转化的需求日益提升。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)来源广泛, 不仅自我更新能力强、能够分化成多种类型的成体细胞, 而且其自身具有免疫调节能力, 不易引发免疫排斥反应, 在干细胞功能分化研究和临床应用中具有巨大应用前景和应用潜力。目前, 传统的细胞培养方式培养效率低、细胞活性较差, 不能满足日益增长的研究和应用需求。本研究利用微载体结合旋转瓶的悬浮培养方法, 通过优化细胞接种量及转速等影响因素, 快速获得大量高质量的人脐带间充质干细胞。经悬浮培养总细胞量可高达 7×10^8 个细胞/L, 而且细胞活性较高, MSC 特异性标记物表达良好, 在恢复平面培养后仍能维持 MSC 的正常细胞形态和增殖能力。高效脐带间充质干细胞悬浮培养体系的初步建立, 为未来的干细胞功能分化研究和临床应用奠定了基础。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 3D 悬浮培养体系; 平面(2D)培养体系; 微载体

Culturing of human umbilical cord mesenchymal stem cells via a 3D suspension culture system using the microcarrier

Xia Li^{1,2,3}, Huijuan Hua^{2,3}, Jie Hao^{2,3}, Liu Wang^{2,3}, Zhonghua Liu¹

1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China

2. Beijing Stem Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

Abstract: With the rapid development of stem cell research, the demands for high quality stem cells in cell differentiation studies, cell therapy and clinical applications increase significantly. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) hold great potentials in these applications due to its wide availability, self-renewal capacity, good pluripotency, and in particular, self-immunomodulation ability. However, the conventional adherent culture system remains challenging in mass production of high-quality stem cells. In this study, we set up a 3D suspension culture system by using spinner flasks added with microcarrier. By optimizing the seeding density and rotation speed, we achieved

收稿日期: 2018-06-15; 修回日期: 2018-09-03

基金项目: 中国科学院重点部署项目(编号: ZDRW-ZS-2016-2)资助 [Supported by the Key Deployment Projects of CAS (No. ZDRW-ZS-2016-2)]

作者简介: 李夏, 硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。E-mail: lixia_bj@foxmail.com

通讯作者: 刘忠华, 教授, 博士生导师, 研究方向: 早期胚胎发育与干细胞建系。E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-123

网络出版时间: 2018/9/3 17:22:52

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180903.1722.002.html>

a cell density as higher as 7×10^8 cells/L per vessel. The cultured MSCs had good viability, and the expression levels of the MSC markers were similar to those of 2D-cultured MSCs. After being transferred back into a 2D culture system, the MSCs still maintained normal morphology and proliferation ability. These results indicated that the 3D suspension culture system established in this study provides a fundamental basis for mass production of high-quality MSCs for future research and clinical applications.

Keywords: human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs); 3D Suspension culture system; Adherent (2D) culture system; Microcarrier

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种来源于中胚层的成体干细胞,最早发现于骨髓组织,但广泛分布在骨髓、脐带、脂肪等间质组织中^[1-5]。该类细胞具有自我更新、贴壁生长、能够分化为多种成体细胞的特性^[6,7]。同时, MSCs 具有免疫调节作用,其主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)表达较低,具有较低的免疫原性,不易引发免疫排斥反应^[8,9]。MSCs 还具有旁分泌特性,能够分泌多种调节因子,并作用于炎症区域,促进组织修复^[10-12]。基于以上特性, MSCs 已经成为干细胞临床治疗的理想种子细胞,在再生医学等领域具有巨大的科学和应用前景。随着干细胞临床转化的发展,利用干细胞移植已经能够治疗多种常规医疗手段无法解决的重大疾病,如癌症、免疫疾病、心梗、脊髓损伤、子宫内膜损伤等^[13-16]。在美国国立卫生研究院临床试验网站上已经有 6500 多项注册的干细胞临床试验,并且国际上已经有多种干细胞产品获批上市(www.fda.gov)。但是,不论是干细胞功能分化研究,还是干细胞治疗及器官再生研究,往往需要大量的干细胞,如使用干细胞移植治疗肝、肾和心脏等器官损伤时,需要 $10^9 \sim 10^{10}$ 级别细胞量才可实现组织修复和功能重建^[17-19]。目前,国内常用的常规实验室干细胞制备体系仍为贴壁培养体系,细胞产量很大程度上受到培养容器的限制,若要获得大量细胞则需要增加培养容器的数量。以实验室常用的细胞培养瓶为例,一个 T225 细胞培养瓶中的细胞量约为 1×10^7 ,一次细胞治疗所需的细胞量就需要约 100 个 T225 培养瓶,不仅效率低,而且耗时耗力,在制备过程中污染风险大,批次间的稳定性差,大大增加了干细胞治疗的成本^[20,21]。因此,用于干细胞治疗的功能细胞需要标准化、批

量化、规模化生产制备,才能满足未来细胞治疗的需求。

本研究利用微载体和旋转瓶,通过优化细胞接种量及搅拌转速等影响因素,初步建立了一种高效的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)悬浮培养体系。通过此体系悬浮培养的 hUCMSCs,具有较高的细胞活率,且正常表达 hUCMSCs 特异性标记物^[22]。在 3D 转 2D 培养后,能够维持典型的 hUCMSCs 形态,并且与平面培养的 hUCMSCs 具有相似的增殖能力。该方法可以用于大量制备 hUCMSCs,为将来标准化、规模化制备 hUCMSCs 提供种子细胞和技术基础。

1 材料和方法

1.1 MSCs 平面培养材料与方法

本研究中使用的 hUCMSCs 来源于北京干细胞库。hUCMSCs 复苏:在 15 mL 离心管中加入 3 mL 预热好的 MSCs 培养基,将冻存管从液氮中取出,37℃ 快速解冻细胞至固液混合态,将细胞悬液加入离心管中,1200 r/min 离心 3 min,弃上清。加入适量 hUCMSCs 培养液重悬并计数,根据细胞量将悬液接种到 10 cm 培养皿中,补足 hUCMSCs 培养基至 10 mL,轻轻摇匀后放入 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养,隔天换液。hUCMSCs 传代:吸弃培养皿中的培养液,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗一遍,加入 37℃ 预热的 0.05%胰蛋白酶约 3 mL,放入 37℃ 培养箱中消化 3 min,在镜下观察细胞飘起变圆后加入等量培养基终止消化,1200 r/min 离心 3 min,弃上清,加入适量 MSCs 培养液重悬并

计数, 根据细胞量将悬液接种到 10 cm 培养皿中, 补足 MSCs 培养基至 10 mL, 轻轻摇匀后放入 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养, 隔天换液。hUCMSCs 冻存: 吸弃培养皿中的培养液, PBS 洗一遍, 加入 37 °C 预热的 0.05% 胰蛋白酶约 3 mL, 放入 37 °C 培养箱中消化 3 min, 在镜下观察细胞飘起变圆后加入等量培养基终止消化, 1200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入适量 4 °C 预冷的冻存液, 混匀后以 500 μ L/管分装至冻存管中, 将冻存管放入程序降温盒, -80 °C 过夜, 第二天将冻存管转移至液氮中保存。

1.2 hUCMSCs 微载体悬浮培养

微载体 CytodexTM1 制备: 计算并称量实验所需微载体使用量, 微载体浓度为 2 mg/mL, 用 50~100 g/mL 的 PBS 浸泡 3 h, 使微载体充分膨胀, 弃上清, 用 PBS 洗涤微载体 2 遍, 弃上清, 加入新 PBS, 高压灭菌, 4 °C 保存, 使用前用培养液洗涤微载体; hUCMSCs 微载体悬浮培养: 消化平面的培养 hUCMSCs (方法同 hUCMSCs 传代) 并计数, 根据细胞数量, 按照细胞密度为 1.5×10^5 /mL 接种于 1 L Wheaton 旋转瓶中, 并补充微载体至 2 mg/mL, 将整个装置放置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中, 调整转速至 30 r/min, 第二天观察微载体是否沉降, 提高调转速至 35~40 r/min, 隔天换液, 并每天取样观察细胞生长情况, 消化计数。

1.3 细胞生长曲线绘制

将培养瓶中液体移至 50 mL 离心管中, 待微载体沉降后, 弃上清液, 加入新的培养液, 移至瓶中, 不要吹打, 以免微载体破碎; 使用新的培养液重悬后, 吸取 1 mL 至皿中, 拍照并记录; 将皿中培养液移至离心管中, 用 PBS 冲洗皿中微载体, 一并移至离心管中; 待微载体沉降后, 弃液, 用 PBS 冲洗 3 遍, 至管中无血清成分; 加 0.25% 胰酶 1 mL, 移至皿中消化 3 min, 加等量 MSCs 培养基终止消化, 计数。

1.4 细胞活性检测

使用 Live-Dead 试剂盒对贴附在微载体上的 hUCMSCs 进行活性检测, 取 1 mL PBS 加入 0.5 μ L 钙黄绿素及 2 μ L 黄溴乙吡啶二聚体, 吸取 1 mL 含

细胞的培养液至 3.5 cm 皿中, 弃培养基, PBS 洗一遍, 将含有 Live-Dead 试剂的 PBS 加入皿中, 室温孵育 30 min, 荧光显微镜下观察细胞存活情况。

1.5 流式细胞分析

将细胞悬液转移至离心管中, 待微载体沉降后, 吸弃离心管中的培养液, PBS 洗一遍, 加入适量 37 °C 预热的 0.05% 胰蛋白酶, 放入 37 °C 培养箱中消化 3 min, 在镜下观察细胞飘起变圆后, 加入等量培养基终止消化。1200 r/min 离心 3 min, 弃上清; 加入 2 mL PBS 将细胞重悬, 1200 r/min 离心 3 min, 弃上清; 加入 2 mL PBS 将细胞重悬, 过 40 μ m 细胞筛; 根据需要鉴定的直标抗体数, 将细胞悬液均匀分装至离心管中, 其中包括空白对照; 向离心管中加入 1:100 稀释后的抗体, 总体积 200~400 μ L 即可; 37 °C 避光孵育 30 min; 上样进行流式细胞仪检测。

2 结果与分析

2.1 培养体系优化

在本研究中, 首先以 2D 培养的 hUCMSCs 作为悬浮培养的种子细胞, 并使用 Wheaton 磁力搅拌系统进行后续的悬浮培养(图 1A)。此外, 选用 Cytodex 1 作为悬浮培养的载体(图 1B)。然后对实验进行分组: 微载体密度分别为 2 g/L、5 g/L、10 g/L, 细胞接种密度分别为 5×10^4 个/mL、 1×10^5 个/mL、 2×10^5 个/mL, 培养体积为 100 mL, 每天半量换液, 培养 5 天后进行细胞计数检测。基于前人研究的结果, 多数的 MSCs 悬浮培养的初始转速在 30 r/min 左右^[23~25], 所以, 本研究首先选择了 30 r/min 的转速进行悬浮培养。从初步的实验结果可以看出, 细胞接种量为 1×10^5 个/mL 及 2×10^5 个/mL 的实验组, 其扩增倍数相似, 而 5×10^4 个/mL 实验组的细胞扩增倍数最低(图 1C)。不同的微载体密度对细胞扩增倍数的影响差别不大。基于经济性和操作性方面的考虑, 在后续的实验中选用 2 g/L 的微载体密度。此外, 缩小了细胞接种量的范围, 选择 4 组不同的接种密度: 5×10^4 个/mL、 1×10^5 个/mL、 1.2×10^5 个/mL 和 1.5×10^5 个/mL, 培养 5 d, 每天进行细胞计数并绘制生

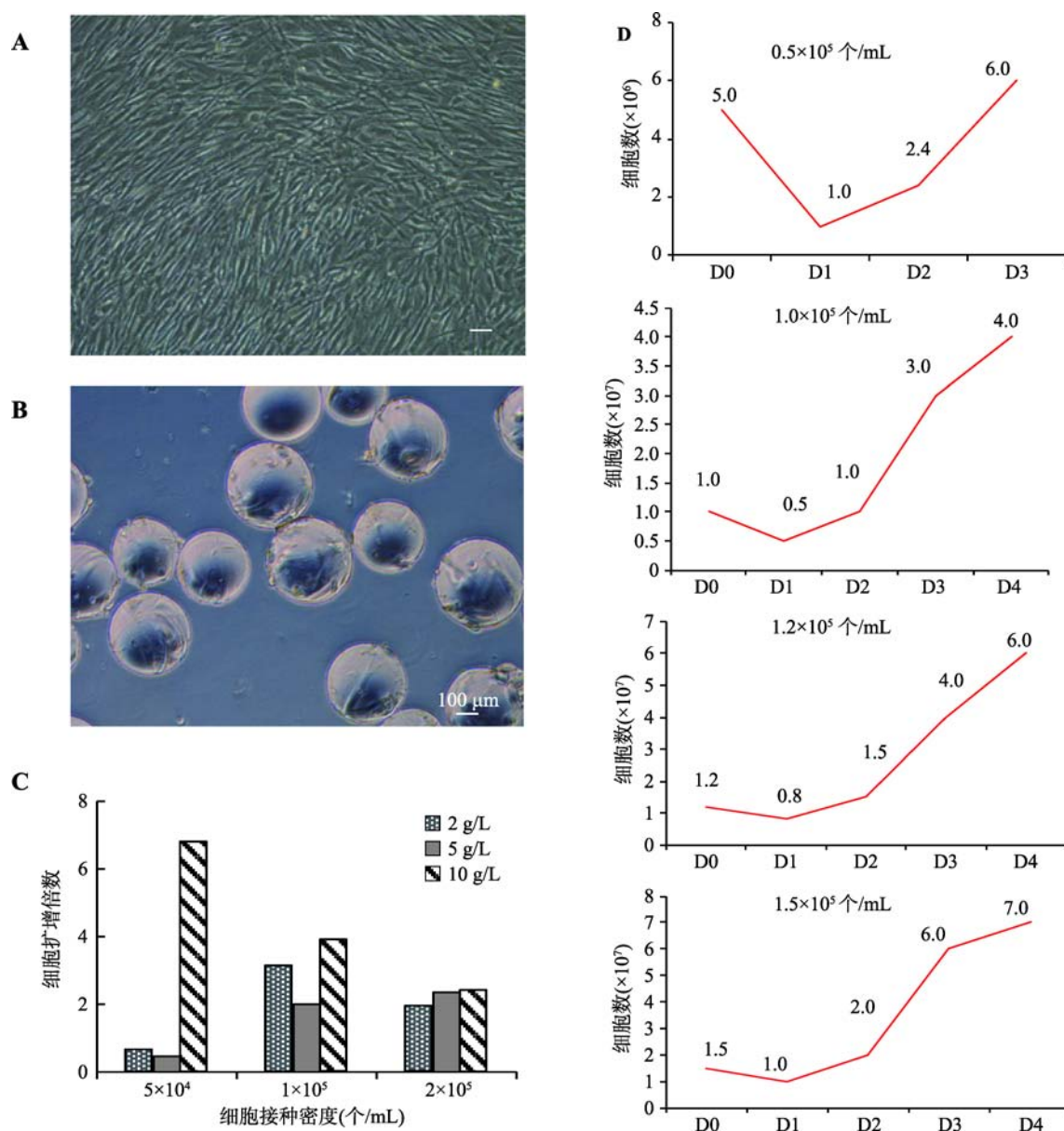


图 1 人脐带间充质干细胞微载体悬浮培养体系的筛选与优化

Fig. 1 Optimization of a 3D hUCMSCs suspension culture system

A: 平面培养的人脐带间充质干细胞形态; B: 在 Cytodex 1 上培养的人脐带间充质干细胞形态; C: 不同细胞密度及微载体浓度对细胞扩增倍数的影响; D: 不同细胞接种密度下 hUCMSCs 悬浮培养生长曲线。D0, D1, D2, D3, D4 指接种后培养天数。标尺= 100 μm。

长曲线。其中, 5×10^4 个/mL 组在培养 1 d 后, 发现有大量细胞死亡。培养 3 d 后, 因细胞量过少而终止实验。而 1×10^5 个/mL, 1.2×10^5 个/mL, 1.5×10^5 个/mL 组的细胞扩增良好, 1.5×10^5 个/mL 组在培养 4 d 后, 细胞量可以达到 7×10^7 个/mL (图 1D)。

2.2 培养体系扩大

在上述 100 mL 培养体系的基础上, 将培养体系

扩大为 300 mL。为防止细胞/微载体沉降^[26], 本研究提高搅拌转速至 35 r/min, 以 2×10^5 个/mL 的较大细胞密度接种, 每天计数, 培养 6 天后, 细胞量可达到 3.9×10^8 个/L。通过比较不同天数细胞形态和生长曲线, 发现培养 3 d 后, 细胞已经在微载体上长满, 细胞量为 3.0×10^8 (图 2, A 和 B)。为获得更大扩增倍数, 在此基础上, 进一步降低初始接种细胞密度, 在 1 L 培养体系中 (图 2C), 以 1.5×10^5 个/mL 细

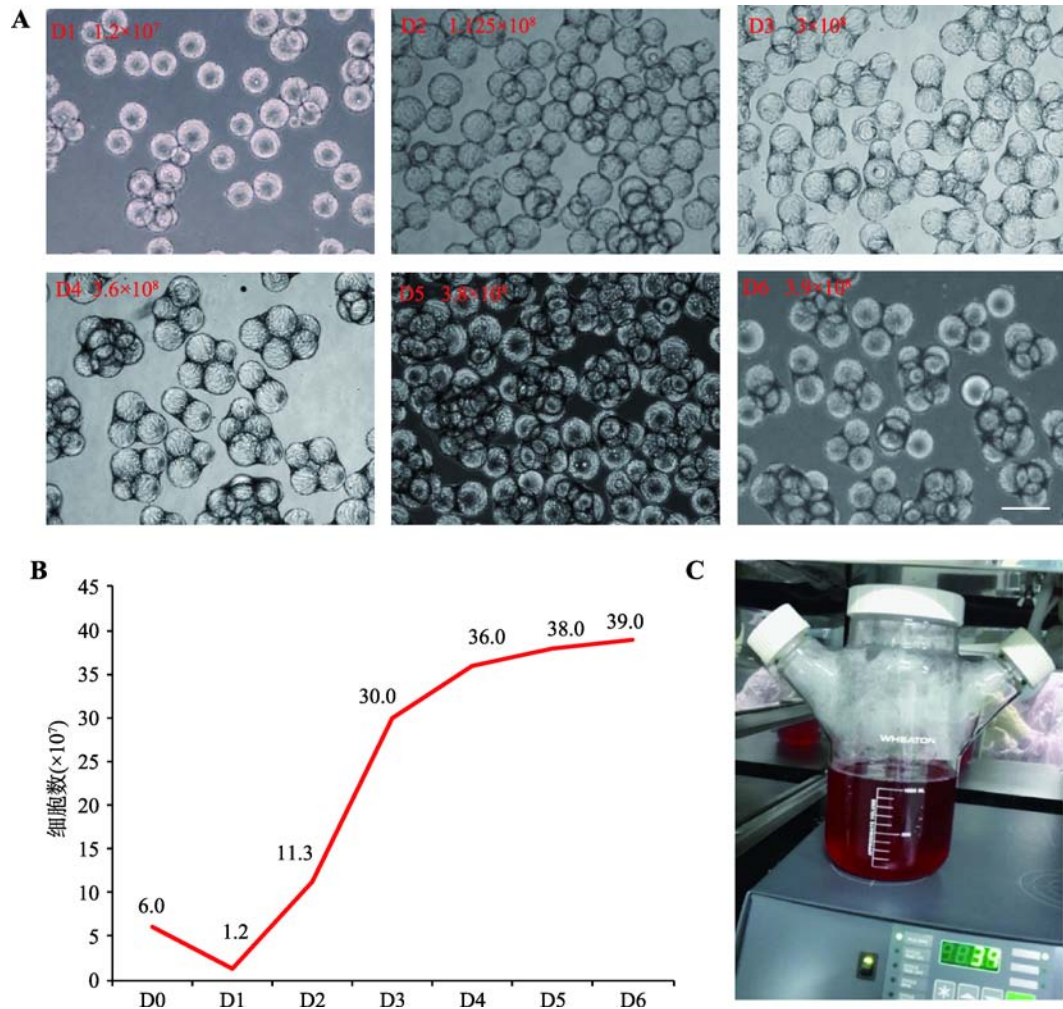


图 2 人脐带间充质干细胞培养体系放大

Fig. 2 Scaling up of hUCMSCs in the 3D suspension culture system

A: 300 mL 体系下不同培养天数的细胞形态; B: 300 mL 体系细胞悬浮培养生长曲线; C: 1 L 培养体系细胞培养瓶及磁力搅拌装置外观。标尺=200 μm 。

胞密度接种, 转速提高至 39 r/min, 培养 3 d 后, 细胞量可达到 7×10^8 个/L (图 3, A 和 B)。值得注意的是, 在已发表的多篇研究报道中, 随着培养天数和细胞量的增加, 为防止微载体沉降, 都采用适当提高了初始转速的改进策略^[24,26-28], 因此本研究在 100 mL 培养体系中使用 30 r/min, 而在 300 mL 和 1 L 培养体系中, 分别使用 35 r/min 和 39 r/min。

2.3 hUCMSCs 细胞生长、形态和活性鉴定

对上述 1 L 培养体系获得的 hUCMSCs 进行 Dead-Live 染色, 结果表明, 细胞活性良好(图 3C)。将悬浮培养的细胞转为平皿培养后, 细胞呈现经典

的 MSCs 细胞形态, 消化细胞进行流式细胞分析, 其 HLA (human lymphocyte antigen)、CD34 和 CD45 为阴性, 并且高表达 CD29、CD73、CD90 和 CD105, 符合 MSCs 特征^[29]。MTT 检测细胞增殖能力与正常 2D 培养细胞相似(图 4, A 和 B)。

3 讨 论

在对培养体系优化的过程中, 本研究发现培养 1 d 后, 所有组别的细胞量都会存在不同程度的下降, 这是由于部分细胞在培养第一天时没有贴壁所致, 而细胞是否贴壁与细胞接种量及搅拌转速有关。当

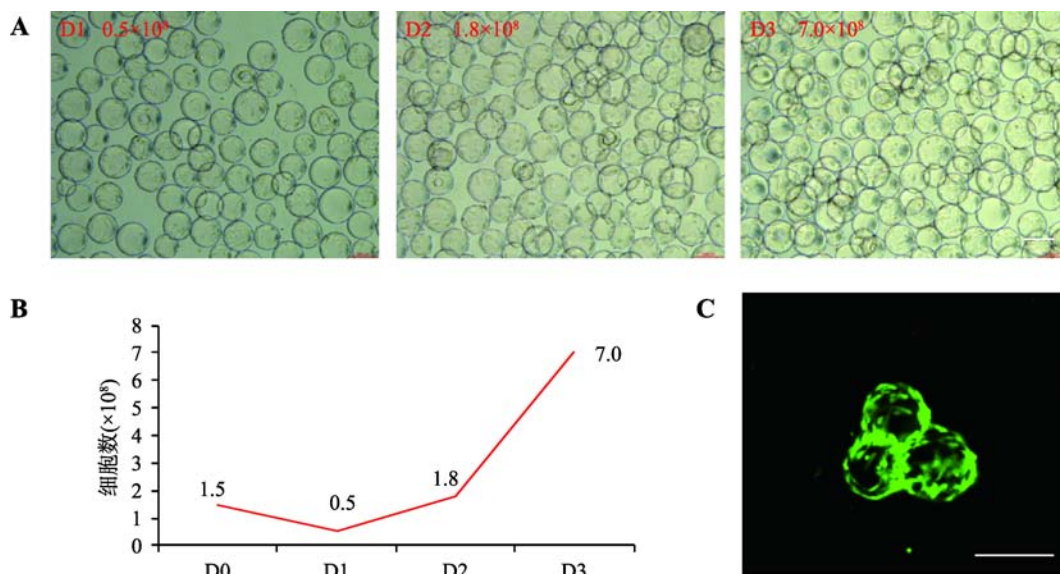


图 3 悬浮培养的 hUCMSCs 细胞生长、形态和活性检测

Fig. 3 Growth, morphology and variability of cultured hUCMSCs

A: 1 L 培养体系下不同培养天数的细胞形态; B: 1 L 体系细胞悬浮培养生长曲线, D0, D1, D2, D3 指接种后培养天数; C: Live-Dead 染色观察细胞存活情况。标尺= 100 μm。

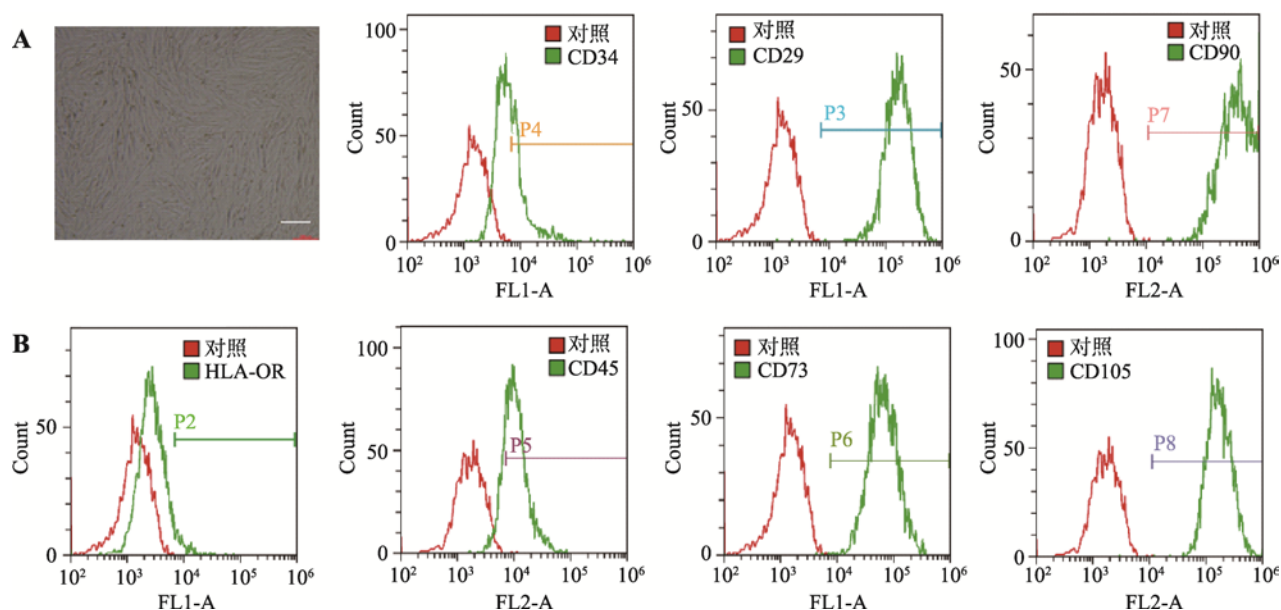


图 4 悬浮培养的 hUCMSCs 转平面培养后细胞形态和特异性标记物的流式细胞分析

Fig. 4 Morphology of hUCMSCs and flow cytometry of hUCMSC-specific markers after transferred into a 2D culture system

A: 3D 转 2D 间充质干细胞的细胞形态; B: 流式细胞分析检测间充质干细胞特异性标记物。标尺= 200 μm。

细胞数量过低时, 较多细胞未贴壁会直接导致细胞量过少无法扩增。就转速而言, 当转速过高时 (如 70 r/min), 细胞不易与微载体结合。而转速过低则会导致形成大量团块, 可能会导致细胞分化或死

亡。因此, 如何优化培养条件, 提高细胞在培养初期 (第 1 d) 的贴壁率, 是 MSCs 悬浮培养的关键问题。目前, 国际上已有多篇使用微载体培养 MSCs 的报道^[30], 例如, Yang 等^[31]在 2007 年使用多种微载体

对大鼠 MSCs 进行了悬浮培养。Eibes 等^[32]对人骨髓间充质干细胞在微载体上在摇瓶中培养进行了探索,发现微载体上有骨髓间充质干细胞生长,且保持间充质干细胞的特性。Schop 等^[33]在 2010 年使用人骨髓间充质干细胞对多种微载体进行了筛选,发现 Cytodex 1 组表现出最高的接种效率与增殖速率,经过 9 d 培养扩增 4.8 倍并达到了 6×10^5 个/mL 的细胞密度,但其培养体系较小。Heathman 等^[34]在 2015 年使用 100 mL 的旋转瓶在无血清、无动物源性成分的体系内对 MSCs 进行悬浮培养,细胞 6 d 内扩增 10 倍,并且保持了良好的细胞状态。Rafiq 等^[35]利用 5 L 的自动化生物反应器培养人间充质干细胞,12 天细胞扩增 6 倍达到了 1.7×10^5 个/mL 的细胞密度。但是,国内该项研究尚未有较为成功的人脐带间质干细胞大规模培养报道。吴清法等^[36]于 2003 年曾尝试利用旋转瓶并添加 CultSpher G 明胶多孔为载体,进行人骨髓间充质干细胞的悬浮培养,在 100 mL 的体系中以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种,转速 30 r/min,经过 7 d 的培养达到 5.15×10^5 /mL 的最大细胞量。该研究主要测定了悬浮培养细胞的生长曲线和代谢产物的变化,未进行更大规模的培养,且该研究使用多孔微载体,不利于后续的细胞消化等操作,限制了其在临床使用上的发展。韩宝三等^[37]也曾尝试在培养瓶中使用 Cytodex 3 微载体对人间充质干细胞进行了小体积(T25 细胞培养瓶)的培养,验证了微载体培养人间充质干细胞的可行性。

本研究通过优化初始接种密度和转速等培养条件,初步建立了一种基于微载体和旋转瓶的高效 hUCMSCs 悬浮培养体系。在 1 L 培养体系中,选用 2 g/L 的微载体密度,以 1.5×10^5 个/mL 细胞初始密度接种,转速 39 r/min,培养 3 d 后,细胞产量可达到 7×10^8 个/L,细胞扩增量可高达 4.67 倍,并且所获得的干细胞活性良好,符合 hUCMSCs 特征。恢复平面培养后,仍能维持 hUCMSCs 的正常细胞形态和增殖能力。该培养体系的优势在于简单、经济、高效,无需复杂昂贵的设备就可以进行操作,培养时程短,并且细胞培养量大,一个批次就可以满足一个病人细胞治疗的需求。人脐带间充质干细胞悬浮培养体系的初步建立,为人间充质干细胞功能分化研究和临床应用奠定了一定的技术基础。后续实

验将使用可降解的微载体,采用自动化的生物反应器,对培养条件进行进一步的优化,如 pH、溶氧等,并扩大培养规模至 2~5 L,为临床应用提供足够的种子细胞,满足 MSCs 临床应用的需求。

参考文献(References):

- [1] Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 3–9. [DOI]
- [2] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1294–1301. [DOI]
- [3] Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 59. [DOI]
- [4] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 2004, 103(5): 1669–1675. [DOI]
- [5] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cell*, 2003, 21(1): 105–110. [DOI]
- [6] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991, 9(5): 641–650. [DOI]
- [7] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8639–8643. [DOI]
- [8] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2003, 31(10): 890–896. [DOI]
- [9] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*, 2005, 12(1): 47–57. [DOI]

- [10] Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*, 2011, 145(6): 926–940. [DOI]
- [11] Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, 4(1): 20. [DOI]
- [12] Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(1): 11–15. [DOI]
- [13] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, 105(4): 1815–1822. [DOI]
- [14] Ohno T, Kaneda H, Nagai Y, Fukushima M. Regenerative medicine in critical limb ischemia. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(10): 883–889. [DOI]
- [15] Zhao Y, Tang F, Xiao Z, Han G, Wang N, Yin N, Chen B, Jiang X, Yun C, Han W, Zhao C, Cheng S, Zhang S, Dai J. Clinical study of neuroregen scaffold combined with human mesenchymal stem cells for the repair of chronic complete spinal cord injury. *Cell Transplant*, 2017, 26(5): 891–900. [DOI]
- [16] Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(1): 11–22. [DOI]
- [17] Mehta J, Mehta J, Frankfurt O, Altman J, Evens A, Tallman M, Gordon L, Williams S, Winter J, Krishnamurthy J, Duffey S, Singh V, Meagher R, Grinblatt D, Kaminer L, Singhal S. Optimizing the CD34 + cell dose for reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(9): 1434–1441. [DOI]
- [18] Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(2): 405–421. [DOI]
- [19] Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, Kooy-Winkelaar EM, Koning F, Zwaginga JJ, Fidder HH, Verhaar AP, Fibbe WE, van den Brink GR, Hommes DW. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 2010, 59(12): 1662–1669. [DOI]
- [20] Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM. Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(6): 350–359. [DOI]
- [21] Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, Krebsbach PH. Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells*, 2013, 31(1): 1–7. [DOI]
- [22] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315–317. [DOI]
- [23] Heathman TR, Stolzing A, Fabian C, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Kara B, Hewitt CJ. Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate. *Cytotherapy*, 2016, 18(4): 523–535. [DOI]
- [24] Carmelo JG, Fernandes-Platzgummer A, Diogo MM, da Silva CL, Cabral JM. A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol J*, 2015, 10(8): 1235–1247. [DOI]
- [25] Sun LY, Hsieh DK, Syu WS, Li YS, Chiu HT, Chiou TW. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Prolif*, 2010, 43(5): 445–456. [DOI]
- [26] Petry F, Smith JR, Leber J, Salzig D, Czermak P, Weiss ML. Manufacturing of human umbilical cord mesenchymal stromal cells on microcarriers in a dynamic system for clinical use. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4834616. [DOI]
- [27] Santos F, Andrade PZ, Abecasis MM, Gimble JM, Chase LG, Campbell AM, Boucher S, Vemuri MC, Silva CL, Cabral JM. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(12): 1201–1210. [DOI]
- [28] Goh TK, Zhang ZY, Chen AK, Reuveny S, Choolani M, Chan JK, Oh SK. Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells. *Biores Open Access*, 2013, 2(2): 84–97. [DOI]
- [29] Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification,

- phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 2016, 99: 62–68. [DOI]
- [30] Jossen V, van den Bos C, Eibl R, Eibl D. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(9): 3981–3994. [DOI]
- [31] Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials*, 2007, 28(20): 3110–3120. [DOI]
- [32] Eibes G, dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol*, 2010, 146(4): 194–197. [DOI]
- [33] Schop D, van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins HJ, de Bruijn JD. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010, 4(2): 131–140. [DOI]
- [34] Heathman TR, Glyn VA, Picken A, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Kara B, Hewitt CJ. Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(8): 1696–1707. [DOI]
- [35] Rafiq QA, Brosnan KM, Coopman K, Nienow AW, Hewitt CJ. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1233–1245. [DOI]
- [36] Wu QF, Wu CZ, Dong B, Wang LS. Cultivation of human mesenchymal stem cells on macroporous Culti-Spher G microcarriers. *J Exp Hematol*, 2003(1): 15–21. 吴清法, 吴祖泽, 董波, 王立生. 微载体悬浮培养成人骨髓间充质干细胞. 中国实验血液学杂志, 2003(1): 15–21. [DOI]
- [37] Han BS, Shen BY, Peng CH, Shi MM, Cheng DF, Wang XM, Wang ZH, Zhou GW, Li HW. Scale-up culture of adult human mesenchymal stem cells on microcarrier Cytodex 3. *J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci*, 2006(6): 581–585. 韩宝三, 沈柏用, 彭承宏, 施敏敏, 程东峰, 王小明, 王兆海, 周光文, 李宏为. 微载体 cytodex 3 大量扩增成人骨髓间充质干细胞的初步研究. 上海交通大学学报(医学版), 2006(6): 581–585. [DOI]

(责任编辑: 高绍荣)