上海交通大学医学院 学者介绍 Author introduction

姜　萌 博士

主任医师、副教授、硕士生导师

ORCID ID：0000–0003–3180–8419

JIANG Meng

M.D

Chief Physician, Associate Professor, Master's Supervisor

ORCID ID: 0000–0003–3180–8419

姜　萌（1976—）上海交通大学医学院附属仁济医院心内科主任医师、副教授、硕士生导师。2007 年获上海交通大学医学院临床医学博士学位，2012–2014 年在美国杜克大学任访问学者。现任美国心脏磁共振协会国际推广委员会（International Outreach Committee）委员、美国心脏磁共振协会公共关系委员会（Public Relation Committee）委员、Penn-China 协作组委员、上海市医学会内科委员会青年委员、上海市医学会心血管病心衰分会委员、上海市黄浦区青联委员。

• 从事心血管疾病领域的医学、教学和科研工作，主要关注心脏磁共振在心血管疾病领域的应用、干细胞介导的基因治疗。发表 SCI 收录论文 20 余篇，主持包括 3 项国家自然科学基金在内的 8 项课题，获国家发明专利 1 项。获上海市卫生系统银蛇奖，入选上海市科技启明星计划、上海交通大学百人计划、上海市教育委员会高峰高原学科建设计划，并作为主要完成人获得上海医学科技奖一等奖、教育部科技进步奖二等奖。

JIANG Meng born in 1976, chief physician, associate professor, and master's supervisor in Department of Cardiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. She got her M.D from Shanghai Jiao Tong University in 2007 and acted as a visiting scholar in Duke University from 2012 to 2014. Currently, she is a committee member of American Cardiovascular Magnetic Resonance International Outreach Committee and Public Relation Committee, a member of Penn-China Collaborative Group, a youth member of Internal Medicine of Shanghai Medical Association, a committee member of Heart Failure Branch of Cardiovascular Disease of Shanghai Medical Association and youth league member of Huangpu District of Shanghai.

• She engaged in the medical care, teaching and scientific research in cardiovascular diseases, mainly focusing on the application of cardiac magnetic resonance to the field of cardiovascular diseases, and stem cells mediated gene therapy. She published more than 20 articles in SCI indexed journals, presided over 8 projects including 3 National Natural Science Foundation of China, and won one National Invention Patent. She has won "Shanghai Foundation for Eminent Youth Award of Health Care System", and was selected into "Shanghai Science and Technology Star Program" "Shanghai Jiao Tong University 100-Member Program", and "Shanghai Municipal Education Commission-Gaofeng Clinical Medicine Grant Support". As the main accomplisher, she has won first prize of "Shanghai Medical Science and Technology Award", and second prize of "Ministry of Education Science and Technology Progress Award".

论著 · 基础研究

单个细胞来源胎盘间充质干细胞培养方法的比较研究

孙宝航行[1]，鲁 奕[1]，王怡沁[1]，周嘉乐[1]，林梦璐[1]，宋 玮[2#]，姜 萌[1#]，卜 军[1#]
1. 上海交通大学医学院附属仁济医院心内科，上海 200240；2. 上海中医药大学附属曙光医院心血管科，上海 200021

［摘要］ 目的 · 观察胚胎来源间充质干细胞（placental derived mesenchymal stem cells，PMSCs）在人血小板裂解液（human platelet lysate，HPL）、碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）及传统的胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）不同组合的培养基中的倍增数目及细胞性状，着重探索更合适的 PMSCs 培养体系。方法 · 分离单个细胞来源 PMSCs，扩增后分别用 4 种培养基孵育，分为 FBS 组、FBS+bFGF 组、HPL 组以及 HPL+bFGF 组。观察细胞形态及生长状态、细胞表型及多能分化。在 P1、P2、P3、P4 代进行计数。取 P4 代细胞接种，分析集落形成单位的个数。结果 · 经鉴定，PMSCs 具有间充质干细胞的生物特性。数量上，FBS+bFGF 组在 P4 代达到（1.12×10^7）个 /cm^2，HPL 组达到（1.24×10^7）个 /cm^2（P>0.05），而 FBS 组和 HPL+bFGF 组则只有（5.58×10^6）个 /cm^2 和（8.56×10^6）个 /cm^2。细胞形态上，FBS+bFGF 组与 HPL 组 P4 代的 PMSCs 均保持贴壁生长，但 HPL 组细胞于 P5 代无法贴壁生长。细胞集落数量上，P4 代时，FBS+bFGF 组为 51 个 / 孔，HPL 为 52 个 / 孔（P>0.05）。细胞生物学特性上，FBS+bFGF 组和 HPL 组在 P4 代时均能基本保有间充质干细胞的特性和多能分化的能力。结论 · 从细胞数量上来看，HPL 组中的 P4 代细胞数与目前常用的 FBS+bFGF 培养基没有显著差异，且已达到临床治疗剂量需求；从细胞生物学特性上来看，HPL 培养基与 FBS+bFGF 培养基均能基本保持 PMSCs 细胞特性和多能分化的能力。但由于 HPL 培养基免疫原性低，因此更适合临床移植应用。然而，由于 HPL 培养基无法维持 PMSCs 生长至 5 代以后，故无法用于大规模细胞扩增。HPL+bFGF 在目前实验条件下并不具备优势。

［关键词］ 胎盘来源间充质干细胞；细胞扩增；碱性成纤维生长因子；人血小板裂解液
[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.09.006 ［中图分类号］ R329.2$^+$8 ［文献标志码］ A

Comparative cultivation of single cell derived placental mesenchymal stromal cells *in vitro*

SUN Bao-hangxing[1], LU Yi[1], WANG Yi-qing[1], ZHOU Jia-le[1], LIN Meng-lu[1], SONG Wei[2#], JIANG Meng[1#], BU Jun[1#]
1. Department of Cardiology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240, China; 2. Department of Cardiology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

[Abstract] **Objective** · To explore optimal placental derived mesenchymal stem cells (PMSCs) culture medium using different combination of human platelet lysate (HPL), basic fibroblast growth factor (bFGF) and traditional fetal bovine serum (FBS) for further basic and clinical study. **Methods** · Single cell derived PMSCs was harvested and incubated with 4 kinds of culture, i.e, FBS, FBS+bFGF, HPL and HPL+bFGF. The morphology, growth state, cell phenotype and multi-energy differentiation were observed. Cells of P1, P2, P3 and P4 generation were counted respectively. The number of units of colony formation was analyzed by inoculating P4 cells. **Results** · It was identified that PMSCs had the biological properties of MSCs. Quantificationally, cell density reached (1.12×10^7) cells/cm^2 in FBS+bFGF group and (1.24×10^7) cells /cm^2 in HPL group (P>0.05) in P4, while those in FBS group and HPL+bFGF group were (5.58×10^6) cells /cm^2 and (8.56×10^6) cells /cm^2, respectively. For cell morphology, the P4 PMSCs of FBS+bFGF and HPL groups kept adherent growth, but the HPL cells could not be adherent in P5 generation. The number of colony was 51/well in FBS+bFGF group, and it was 52/well in HPL group (P>0.05) in P4. The FBS+bFGF group and the HPL group were able to maintain the characteristics of MSCs and the ability of pluripotent differentiation in the P4 generation. **Conclusion** · PMSCs in P4 cultured in HPL medium can keep the biological characteristics and meet the clinical transplantation requirements in quality and quantity, which are preferable for their low immunogenicity to clinical applications. In long term, PMSCs cultured in FBS+bFGF medium are preferable for the longer lasting characters of MSCs and larger quantity in basic studies. HPL+bFGF medium has no advantage on quality and quantity.

[Key words] placental derived mesenchymal stromal cells; cell proliferation; basic fibroblast growth factor; human platelet lysate

间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）一直是干细胞领域的研究热点。由于其具有多向分化的能力，在体外可以被诱导成脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、神经细胞等，因此有着广泛的临床应用。骨髓来源的 MSCs 仍然是当前最常用的 MSCs，但由于获取途径为侵入性，增加了患者痛苦，且骨髓来源的 MSCs 质量和

［基金项目］国家自然科学基金（81270206, 81470391）；上海市教育委员会高峰高原学科建设计划（20172014）；上海交通大学医工交叉 Med-X 基金（YG2014MS49）（National Natural Science Foundation of China, 81270206, 81470391; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20172014; Shanghai Jiao Tong University Medical-Engineering Med-X Foundation, YG2014MS49）。
［作者简介］孙宝航行（1995—），硕士生；电子信箱：bowensun_0719@126.com。
［通信作者］宋 玮，电子信箱：swei222@aliyun.com。姜萌，电子信箱：jiangmeng0919@163.com。卜军，电子信箱：pujun310@hotmail.com。# 为共同通信作者。

数量都随着供者年龄的增长而逐渐降低[1]。上述原因，限制了骨髓 MSCs 在组织工程和临床中的运用[2]。许多研究证明，胎盘来源的 MSCs（placental derived mesenchymal stem cells，PMSCs）较骨髓来源的细胞更易体外扩增，并具有更低的免疫原性[3]，也不涉及伦理道德问题，因而逐渐成为另一种较好的 MSCs 的选择。

然而，目前 PMSCs 并未如骨髓 MSCs 那样在临床研究中得到应用。这与其倍增代数有限、细胞扩增数目有限、传统培养基中的异种蛋白引起的免疫反应等问题有关。目前，大量文献报道人 MSCs 中几乎检测不到端粒酶活性[4]，并且端粒酶逆转录酶的表达量也偏低[5-6]。这解释了 MSCs 培养代数有限的问题，一般多代培养之后细胞多向诱导分化能力逐渐降低，细胞逐渐丧失 MSCs 干性，失去临床应用的价值。因此，临床上一般采用的细胞都为第 5 代以前的细胞[7]。

对于 MSCs 培养基的选择，目前国内外实验室和临床研究的 MSCs 扩增体系主要是基础培养基添加一定浓度胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），其优点在于可以提供维持细胞指数生长的激素、结合蛋白、蛋白酶抑制剂等，并且 FBS 是细胞贴壁、铺展在塑料培养基质上所需因子来源，且能起到酸碱度缓冲液的作用。然而，FBS 中含异种蛋白质，存在携带细菌、病毒等的风险；并且 MSCs 在培养过程中可吞噬培养基中的蛋白，内含牛血清蛋白，可使受者体内产生抗牛蛋白抗体，引起免疫反应，影响疗效[8]。相应地，人血小板裂解液（human platelet lysate，HPL）作为一种新型的无血清添加物，不仅去除了残余的细胞结构，降低了免疫源性，还保留了其中的许多 MSCs 生长所必需的生长因子[9]。本研究拟观察包括 HPL、碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）在内的不同培养基组合的细胞倍增数目及细胞性状，着重探索更合适的 PMSCs 培养体系，以利于更好地扩增 PMSCs 并拓展其应用。

1 材料与方法

1.1 胎盘的处理及单个细胞来源 MSCs 的分离、培养和筛选

取胎盘绒毛膜组织，然后将其剪碎至大小约 1 cm^3 的碎块，用 PBS 冲洗，置于无菌培养皿，用无菌组织剪剪成 2 ～ 3 mm^3 小组织块，使用 0.1%（质量浓度）胶原酶和中性蛋白酶（Worthington 公司）于 37 ℃消化 30 min，加入 FBS 终止酶反应。组织混合液经 200 目滤网过滤后接种于细胞培养瓶中，用含 10% FBS 的 α-MEM 培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞生长至 80% 融合时，用 0.25% 胰酶消化细胞；经过酶消化法获得的为数不多的内皮细胞、成纤维细胞和 MSCs 等，用培养液稀释到 50 个细胞 /10 mL（不超过 70 个），按 100 μL/ 孔加入 96 孔板，以保证每个孔只有 1 个细胞。单个细胞的 MSC 克隆直接在胎盘绒毛膜组织的混合培养物基础上进行，待长成克隆（约 1 000 个细胞），转移到大的培养瓶进行扩增。

1.2 分组

用 α-MEM 培养基（Gibco 公司）为基础配制 4 组不同培养基，扩增后的细胞分别培养于 FBS（ScienCell 公司）组（浓度为 10%）、FBS +bFGF（Peprotech 公司）组（bFGF 浓度为 5 ng/mL）、人 HPL（UltroGRO 公司）组（浓度为 5%）以及 HPL+bFGF 组（bFGF 浓度为 5 ng/mL）。

1.3 PMSCs 鉴定

1.3.1 形态观察 应用倒置显微镜观察细胞形态特点及生长状态并采集图像。

1.3.2 表面标志物测定 根据 2006 年国际细胞治疗协会发布的 MSCs 的鉴定标准[10]，取原代贴壁细胞，常规消化，离心，标记 CD90、CD105、CD73、CD34、CD14、CD45、CD19 和 HLA-DR 抗体（BD Pharmingen 公司）及其相应同型对照，用流式细胞仪检测细胞表型。

1.3.3 多能诱导分化 取原代 PMSCs 培养至第 4 代，常规消化离心后制成单细胞悬液，按 3×10^4 个 / 孔接种于 6 孔板。待细胞融合达 70% 时更换成骨、成脂、成软骨培养基（ThermoFisher 公司）。然后，每 3 d 换液 1 次。21 d 后茜素红染色检测成骨情况，油红 O 染色检测成脂情况，甲苯胺蓝染色观察软骨形成的形态。

1.4 细胞增殖检测

待 4 组细胞分别于第 3 日、第 6 日、第 9 日、第 12 日和第 15 日传代，共传代 5 次，分别进行计数。

1.5 细胞集落形成

分别取 4 组第 3 代（P3）和第 4 代（P4）的细胞，以 80 个 /cm^2 的细胞密度接种于直径为 6 cm 的培养皿，每组 3 个样本。加入含 10% FBS 的 α-MEM 培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。14 ～ 21 d 后，PBS 洗 2 ～ 3 次，甲醇固定 5 min，以 0.1% 结晶紫染色 30 min，晾干，拍照，并用 Leica 倒置显微镜观察集落形成单位（CFU）的个数。实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理，所有数据至少进行 3 次独立实验。采用单因素方差分析比较组间差异。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖

所有 4 个实验组均培养到 P5。结果显示，当细胞培养至 P3 时，各组细胞增殖情况相近（P>0.05）。当细胞培养至 P4 时，FBS+bFGF 组与 HPL 组扩增速度最快，细胞数量最多，分别为（1.12×10^7）个 /cm^2 和（1.24×10^7）个 /cm^2；而 FBS 组和 HPL+bFGF 组则只有（5.58×10^6）个 /cm^2 和（8.56×10^6）个 /cm^2。然而，P4 以后，HPL 组增殖速度明显放缓，到 P5 时细胞已经老化，不再贴壁，因此不再继续计数，而 FBS+bFGF 组生长速度与 P4 相当（图 1、表 1）。

鉴于 FBS+bFGF 及 HPL 组在细胞增殖速度、数量及贴壁上反映出与其他 2 组的明显差异，后续实验我们仅进一步比较这 2 组培养基对细胞性质的影响。

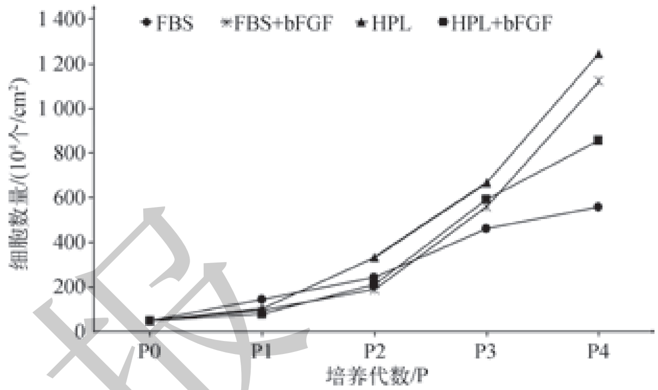


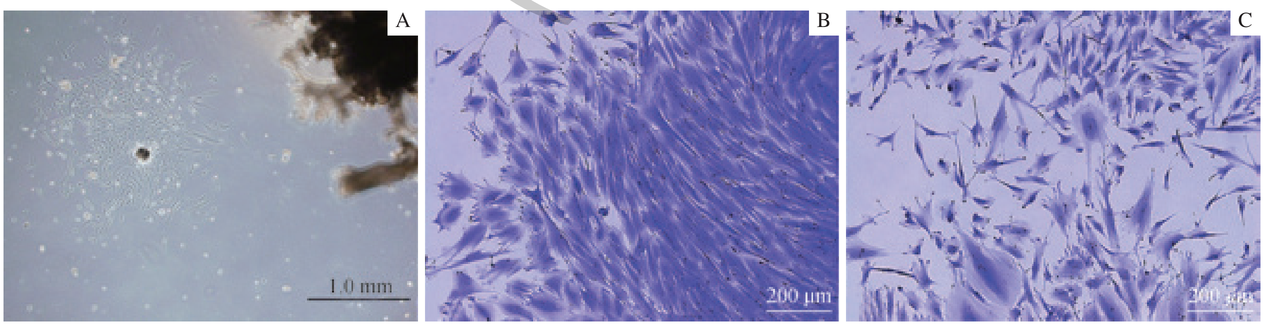
图 1 PMSCs 在不同培养基中的扩增曲线
Fig 1 Amplification curve of PMSCs in different culture medium

表 1 PMSCs 在不同培养基中扩增数量（$\times10^4$ 个 /cm^2）
Tab 1 Amplification of PMSCs in different culture medium ($\times10^4$ cells/cm^2)

培养基	P2	P3	P4
FBS	243.70 (156.00，290.00)	461.45 (234.00，838.36)	558.21 (169.00，1106.63)
FBS+bFGF	190.13 (84.00，328.89)	559.78 (218.00，1233.33)	1123.33 (305.00，2701.00)
HPL	333.61 (94.00，801.84)	688.20 (185.00，1153.59)	1244.74 (535.00，1954.49)
HPL+bFGF	211.51 (53.00，461.00)	592.94 (140.00，1153.83)	855.80 (177.00，1534.60)

2.2 细胞形态

原代细胞培养 2 ~ 3 周后，细胞密度达到 80% 融合，观察细胞形态（图 2）。图 2A 为含有胎盘组织的原代细胞，在分离成单个细胞来源后培养和筛选，获得的 PMSCs 为贴壁细胞。细胞贴壁后形态均一，呈梭形或多边形，平行或螺旋生长，符合 PMSCs 的形态特征。实验各组经过传代增殖后，分别于 P1、P2、P3、P4 和 P5 进行形态学鉴定。P4 之前各组细胞形态均未发生改变，依旧贴壁生长（图 2 B、C）。P5 时，FBS 组以及 FBS+bFGF 组的细胞依旧贴壁生长，而 HPL 组及 HPL+bFGF 组细胞由于老化，形态发生改变，先成铺路石样，后不再贴壁生长。



注：A. 含有胎盘组织的原代细胞；B ~ C. 单个细胞来源的 PMSCs 在 FBS+bFGF 培养基（B）和 HPL 培养基（C）中的形态。

图 2 PMSCs 形态学鉴定
Fig 2 Morphological identification of PMSCs

2.3 细胞集落形成能力

在 P3 ～ P5 时，FBS+bFGF 组始终保持细胞集落形成迅速，为 51 ～ 73 集落 / 孔；而相应的 HPL 组的集落形成数量为 43 ～ 52 集落 / 孔（表 2）。结果提示，当细胞培养到 P4 时，无论是目前常用的 FBS+bFGF 培养基还是 HPL 培养基，都具有使得 PMSCs 形成集落的能力。由于 P5 时，HPL 组细胞已经不再贴壁生长，故不进行集落形成能力测定，相应地，FBS+bFGF 培养基组仍具备集落形成能力。

表 2 PMSCs 集落培养结果
Tab 2 Results of PMSCs colony assay

培养代数	FBS+bFGF（集落 / 孔）	HPL（集落 / 孔）
P3	73	43
P4	51	52
P5	59	不贴壁，未计数克隆

2.4 细胞表面标志物测定

当细胞传代至 P4 时，分别对各实验组进行表面标志物分析。结果显示，目前 FBS+bFGF 培养基可以维持 MSCs 的特异阳性表达（>95%）CD90、CD105 和 CD73，阴性表达（<2%）CD34、CD14、CD45、CD19 和 HLA-DR；而 HPL 培养基的细胞于 P4 时 CD90 的阳性率略有下降，为 85.4%，说明细胞的纯度略有下降（表 3）。

表 3 PMSCs 的流式细胞术鉴定
Tab 3 PMSCs identification by flow cytometry

表面标志物	FBS+bFGF	HPL
CD90	99.0%	85.4%
CD105	99.2%	98.7%
PCD73	98.0%	99.6%
CD45	<2%	<2%
CD14	<2%	<2%
CD34	<2%	<2%
CD19	<2%	<2%
HLA-DR	<2%	<2%

2.5 细胞诱导分化

在 P4 时分别予以 FBS+bFGF 组和 HPL 组诱导分化。结果显示，原代细胞加入成脂肪诱导液，诱导 21 d 后固定，加入油红 O 染色观察，显微镜下可以看到红色脂肪滴。加入成骨诱导液 21 d 后，进行茜素红染色，可观察到钙盐沉积。加入成软骨诱导液培养 21 d 后，进行甲苯胺蓝染色，可观察到软骨形成（图 3）。无论是用 FBS+bFGF 培养的细胞，还是用 HPL 培养的细胞，依旧可以向脂肪细胞、骨和软骨细胞分化。

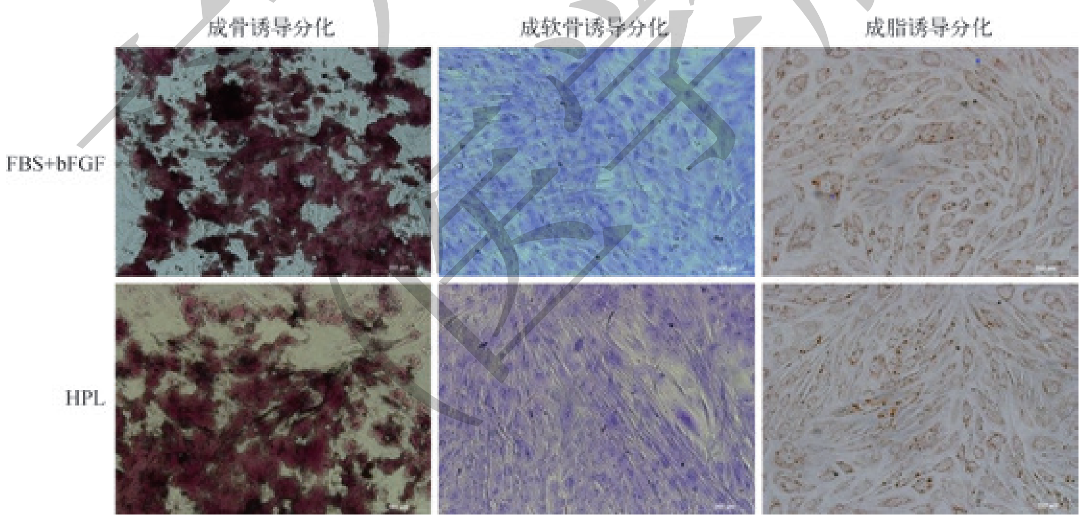


图 3 不同培养基中观察 PMSCs 多能分化
Fig 3 Pluripotent differentiation of PMSCs in different culture medium

3 讨论

本实验成功分离并获得了单一细胞来源的滋养层 PMSCs，且对其进行体外培养，通过此纯化后的 PMSCs 来观察不同培养基对细胞扩增、分化特性的影响。单个细胞 MSC 克隆直接在胎盘绒毛膜组织的混合培养物基础上进行。在培养过程中，我们注重细胞的均一性，这也是我们进行单个细胞克隆的原因。根据国际 MSCs 的鉴定标准[10]，本研究中采用的 PMSCs 经细胞形态学观察、表面分子流式细胞术测定以及细胞多能分化能力评估均证实具有 MSCs 特性。鉴于 FBS+bFGF 组及 HPL 组在细胞增殖速度、数量及贴壁能力上反映出与其他 2 组的明显差异，

后续实验我们仅进一步比较 FBS+bFGF 及 HPL 培养基对于细胞性质的影响。

初步得出以下结果：HPL 作为新兴的培养基成分，HPL 组 P4 时的 PMSCs 形态、表面标志物、多能分化潜能、集落形成能力等方面均基本符合 MSCs 特点，仅细胞表面标记物 CD90 百分比稍低（85.4%）。这说明细胞纯度在培养过程中略有降低，但细胞仍具有多能分化能力，因此对细胞的质量影响不大。此代细胞依旧存在干性且具有自我更新的能力，数量与质量均达到了临床应用的标准；因其培养速度快，周期短，免疫原性低，可成为更优的临床选择。然而，P5 时的 HPL 组细胞形态学已经发生改变，细胞数目也不再增长，因此临床应用困难。反观含有传统 FBS 的 FBS+bFGF 组 P5 时仍然保持着间充质干细胞的特性，且拥有更多数量的 PMSCs。因此对于需要大量细胞的基础实验，运用传统 FBS 培养基培养 PMSCs 成为更优的选择。在实验之初设定的第 3 种培养基组合——HPL+bFGF 组在目前实验条件下，从数量和质量上看都不具备优势。究其原因，可能与 HPL 中本身含有一定浓度的 bFGF 有关；虽然能够使细胞增殖速度加快，但与此同时也加速其衰老。

自 2009 年开始，有学者尝试使用 HPL 培养脂肪来源的 MSCs[11]。其作用机制除了无动物源性血清外，HPL 有着天然修复蛋白质组的作用，可支持 MSCs 增殖和染色体稳定[12]，同时又降低对 T 细胞和 NK 细胞增殖和功能的抑制能力[13]。国内外学者目前也通过各种手段尝试在基础培养基的基础上添加其他因子来延缓 MSCs 的衰老[14]。有研究提出在培养基中添加褪黑素可通过 SIRT1 依赖的通路反转 MSCs 中 H_2O_2 诱导的早衰，更长久地保持细胞的活性[15]。褪黑素本身对于 MSCs 的分化也有一定的影响[16]。另有研究指出在长期培养过程中，促红细胞生成素能维持 MSCs 未分化潜能，延缓细胞衰老[17-18]。改造端粒酶活性也在近来被用于 MSCs，以期延长其传代代数从而增加细胞数量[19-22]。

本实验的不足之处在于：在细胞数量研究上，不同培养基对于细胞增殖的影响存在批次差别，这是由不同批次的细胞状态决定的，导致本实验各组细胞虽有数量差异，但未达到统计学意义。另外，由于尚未出台针对 PMSCs 的鉴定标准，因此目前本实验对于 PMSCs 的鉴定是根据骨髓 MSCs 的相关标准。而已有研究表明[21]，不同来源的 MSCs 的细胞表面标志物可能有所不同。

总体来看，FBS 添加 bFGF 依旧是良好的培养体系，可为基础研究提供大量优质的实验细胞，而 HPL 培养基在短期扩增中有优异表现且其低免疫原性的特点使其在临床方面的应用将会比传统培养基更具优势。但是，如何使 HPL 培养出的细胞更长久地保持纯度、活力与干性还需要进一步的研究。

参·考·文·献

[1] Kaper G, Mao L, Geisler S, et al. Impact of donor age on functional behaviour and protein expression pattern of mesenchymal stem cells[J]. J Stem Cells Regenerative Medicine, 2007, 2 (1): 167.
[2] Jeon YJ, Kim J, Cho J, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy[J]. J Cell Biochem, 2016, 117 (5): 1112-1125.
[3] Luan X, Li G, Wang G, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood $CD34^+$ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Tissue Cell, 2013, 45 (1): 32-38.
[4] Zhao YM, Li JY, Lan JP, et al. Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369 (4): 1114-1119.
[5] Wei LL, Gao K, Liu PQ, et al. Mesenchymal stem cells from Chinese Guizhou minipig by hTERT gene transfection[J]. Transplant Proc, 2008, 40 (2): 547-550.
[6] Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20 (6): 592-596.
[7] 白金萍，李秀英，李雪，等. 胎盘间充质干细胞传代后的增殖能力 [J]. 中国组织工程研究，2014, 18 (10): 1591-1596.
[8] Schmidt D, Joyce EJ, Kao WJ. Fetal bovine serum xenoproteins modulate human monocyte adhesion and protein release on biomaterials *in vitro*[J]. Acta Biomater, 2011, 7 (2): 515-525.
[9] Eastment CT, Sirbasku DA. Human platelet lysate contains growth factor activities for established cell lines derived from various tissues of several species[J]. In Vitro, 1980, 16 (8): 694-705.
[10] 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[J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4): 315-317.
[11] Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate[J]. Transfusion, 2009, 49 (12): 2680-2685.
[12] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability[J]. Cell Transplant, 2011, 20 (6): 797-811.
[13] Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L, et al. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function[J]. Eur J Immunol, 2011, 41 (11): 3281-3290.
[14] Salzig D, Leber J, Merkewitz K, et al. Attachment, growth, and detachment of human mesenchymal stem cells in a chemically defined medium[J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 5246584.
[15] Mehrzadi S, Safa M, Kamrava SK, et al. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen peroxide induced toxicity in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells[M]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(7): 773-786. ,
[16] Luchetti F, Canonico B, Bartolini D, et al. Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review[J]. J Pineal Res, 2014, 56 (4): 382-397.
[17] Ercan E, Bagla AG, Aksoy A, et al. *In vitro* protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin[J]. Acta Histochem, 2014, 116 (1): 117-125.
[18] Ye L, Chen L, Yu Q, et al. Effect of recombinant human erythropoietin on the stemness of bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. Int J Stem Cells, 2010, 3 (2): 175-182.
[19] Bischoff DS, Makhijani NS, Yamaguchi DT, et al. Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells[J]. BioRes Open Access, 2012, 1 (6): 273-279.
[20] Madonna R, Taylor DA, Geng YJ, et al. Transplantation of mesenchymal cells rejuvenated by the overexpression of telomerase and myocardin promotes revascularization and tissue repair in a murine model of hindlimb ischemia[J]. Circ Res, 2013, 113 (7): 902-914.
[21] Okada M, Kim HW, Matsu-ura K, et al. Abrogation of age-induced microRNA-195 rejuvenates the senescent mesenchymal stem cells by reactivating telomerase[J]. Stem Cells, 2016, 34 (1): 148-159.
[22] Lü FJ, Tuan RS, Cheung KM, et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 32 (6): 1408-1419.

［收稿日期］2018-05-17 ［本文编辑］邵碧云