

技术与方法

热灭活补体活性的血清对间充质干细胞和免疫细胞培养的优化效应

王婷婷 欧明慧 曹丽娟*

(苏州大学苏州医学院转化医学研究院, 辐射医学与防护国家重点实验室, 苏州 215123)

摘要 该研究目的在于评估胎牛血清热灭活对细胞培养的影响。对经56 °C、30 min热灭活前后的血清配制培养基培养的人脐带来源间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)和人外周血来源单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 进行增殖速率、免疫调控蛋白表达水平、T细胞增殖速率的检测, 比较血清热灭活对细胞培养的影响。结果显示, 热灭活前后的两种血清对hUCMSCs的形态没有影响, 但热灭活处理能够提高hUCMSCs增殖速率以及响应炎症因子的能力从而使其表达更多的免疫调控蛋白IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase)和COX-2(cyclooxygenase 2); 此外, 热灭活的血清能够显著提高T细胞的体外增殖速率。补体系统活性的标志蛋白C3a在热灭活血清中显著下调。向含有未热灭活血清的培养基中加入补体活性抑制剂compstatin, 同样能够提高hUCMSCs的增殖速率和免疫抑制能力。综合以上结果, 该文研究表明, 56 °C、30 min热灭活血清处理能够通过热灭活补体系统提高干细胞的增殖能力、免疫调控效应以及T细胞的增殖速率, 建议在科研实验中使用热灭活的血清以优化细胞培养程序。

关键词 血清; 热灭活; 间充质干细胞; 外周血单个核细胞; 补体

Optimal Effects of Heat-Inactivated Complement Serum on Mesenchymal Stem Cell and Immune Cell Cultures

WANG Tingting, OU Minghui, CAO Lijuan*

(Institutes for Translational Medicine, State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract This study was aimed to evaluate the effect of heat-inactivated fetal bovine serum on cell culture. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells and human peripheral mononuclear cells were cultured in the medium with unactivated and heat-inactivated serum in 56 °C for 30 min. There were significant differences between unactivated and heat-inactivated serum in regard to the rate of proliferation of mesenchymal stem cell, levels of immunoregulatory proteins and rate of proliferation of T cells. The results showed that there was no difference in the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultured with heat-treated or untreated serum, but the proliferation rate and expression levels of immune regulatory proteins IDO and COX-2 were

收稿日期: 2022-08-25 接受日期: 2022-10-25

国家自然科学基金青年项目(批准号: 31900635)和苏州市科技计划民生科技项目(批准号: SYS2020087)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15651107787, E-mail: ljcao@163.com

Received: August 25, 2022 Accepted: October 25, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31900635), and the Suzhou Science and Technology Initiative (Grant No.SYS2020087)

*Corresponding author. Tel: +86-15651107787, E-mail: ljcao@163.com

increased by cultured with heat-inactivated serum. In addition, heat-inactivated serum could significantly increase the proliferation rate of T cells. Additionally, complement C3a, which reflected the activity of complement system, was downregulated after heat inactivation. However, the proliferation of hUCMSCs cultured in medium contained unactivated serum was also increased through inhibiting the activity of complement using compstatin. Besides that, compstatin treatment also upregulated the IDO and COX-2 expression levels cultured in unactivated serum contained medium. In conclusion, heat-inactivated serum at 56 °C for 30 min could enhance the immune regulation ability of stem cells and increase the proliferation rate of T cells. Therefore, heat-inactivated serum was recommended in scientific research experiments.

Keywords serum; heat-inactivated; mesenchymal stem cells; peripheral mononuclear cells; complement

血清是由血浆去除纤维蛋白得到的一种复杂混合物,其组成成分虽大部分已知,但还未完全明确,且血清组成及含量常随供血动物的性别、年龄、生理条件和营养条件不同而有所差异。由于血清能够提供细胞生长所需的贴壁因子、免疫球蛋白、胰岛素等其他营养成分及细胞因子,因此成为体外细胞培养液中的常用添加成分。血清中含有各种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、生长因子、激素、无机物等,这些物质可以影响细胞的增殖表型^[1]。牛血清是科研实践中细胞培养程序中使用最广泛的天然培养基,含有丰富的细胞生长所必需的营养成分,常用于动物细胞的体外培养,具有极为丰富且重要的功能。其中,胎牛血清是品质最高的,因为胎牛还未接触外界,血清中所含的抗体、补体等对细胞有害的成分最少^[2]。胎牛血清中含有多种生长因子和细胞因子,可以维持细胞的生长和增殖;含有大量的蛋白成分,如白蛋白、抗胰蛋白酶、转铁蛋白、IgG类抗体、脂蛋白等,血清含有充足的蛋白,是药物生产和研发用细胞培养的关键成分。TIRGLIA等^[3]和NISHIOKA等^[4]发现,胎牛血清中含有补体成分C1、C3、C6以及其他补体成分。这些补体成分可能对细胞的生长增殖也有作用。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)起源于发育早期的中胚层和外胚层,是具有多向分化及自我更新潜能的成体干细胞。目前, MSCs可以从骨髓、胎盘、脂肪、脐带、牙髓、肌肉等多种组织中分离获得,其中,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)因取材方便、来源广泛、免疫原性低且不存在伦理问题等众多优势,已成为最具有应用潜力的种子细胞。多年的动物和临床试验证明, hUCMSCs具有广阔的转化应用前景,可用于治疗肝肾损伤、神经系统疾

病、自身免疫性疾病、心血管疾病以及糖尿病等代谢类疾病。然而,良好的MSCs培养环节是开展相应科学研究的重要保障^[5-8]。

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)是临床免疫学研究中常用的细胞群体。PBMCs包括多种淋系和髓系免疫细胞,例如T细胞、嗜中性粒细胞以及单核细胞等。T细胞在体外被刺激激活后,细胞代谢方式和形态相继发生改变,24~48 h内细胞内蛋白质和核酸的合成增加,发生一系列细胞增殖表型变化,包括细胞变大、出现空泡、核仁明显、核染色质疏松等,由淋巴细胞转变为淋巴母细胞。因此,这种淋巴细胞增殖又被命名为淋巴细胞转化。据此,通过该过程可判断出淋巴细胞对有关刺激的反应性与功能状态。

在目前的基础实验中,胎牛血清一般会经过56 °C、30 min热灭活补体后才能被投入使用^[9-12]。PINYOPUMMINTR等^[9]证明去除热灭活步骤的血清并不影响牛胚胎细胞的生长分化。GIARD等^[13]证实热灭活步骤减弱了胎牛血清和小牛血清对细胞的促黏附作用。所以为了研究胎牛血清热灭活与否对hUCMSCs培养效益的差别,我们分别使用热灭活和未热灭活的胎牛血清培养hUCMSCs,并检测一系列相关功能指标。IDO和COX-2的表达水平是MSCs免疫调控能力的重要指标。在组织损伤过程中,淋巴细胞和单核细胞可以分泌大量的炎症因子。在炎症因子的刺激下, MSCs可以分泌大量的趋化因子, NO或IDO。淋巴细胞可以通过趋化因子的作用被趋化至MSCs附近, MSCs进一步通过分泌的NO或IDO抑制淋巴细胞的激活和增殖^[14]。COX-2是表达在MSCs内质网和内外膜上的一种酶, COX-2可以通过调控PGE2(prostaglandin E2)的表达从而调控淋巴细胞和单核细胞的免疫调控状态^[15]。所以我们检测

了两种培养基(热灭活或未热灭活血清配制)培养的hUCMSCs的增殖速率和IDO、COX-2的表达水平。此外,CD3抗体(anti-CD3)可刺激PBMC,从而诱发其内的T细胞快速增殖,利用此研究体系探究血清热灭活对T细胞增殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 CCK-8细胞试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;0.25%胰蛋白酶消化液、DMEM培养基、RPMI培养基购自苏州亿邦生物科技有限公司;青霉素/链霉素混合溶液、胎牛血清、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自英潍捷基(外贸)有限公司;C3a检测试剂盒、C3 ELISA试剂盒和compstatin购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.1.2 细胞 本实验中所用到的细胞为人来源的脐带间充质干细胞(hUCMSCs)和来源的外周血单个核细胞(PBMCs),脐带和外周血来源于苏州大学附属第一医院,所有组织和外周血捐献者均知情同意,且实验已通过苏州大学伦理委员会审批(批准号:SUDA20210916A07)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8检测细胞增殖活力 准备约 2×10^6 个hUCMSCs,加入胰酶消化1 min,加入6 mL完全培养基终止消化,收集细胞悬液,1 000 r/min离心5 min。用培养基重悬细胞沉淀,并计数。计算好所需细胞数,分别加入两个离心管进行离心,1 000 r/min离心5 min。使用两种培养基(热灭活或未热灭活血清配制)重悬细胞沉淀,将细胞种于96孔板中,每孔种植 4×10^3 个细胞,200 μ L体系。分别在种植细胞后0 h、24 h、48 h、72 h和96 h后加入CCK-8检测试剂,使用Cytation 5仪器(BioTek)检测细胞在波长为450 nm处的吸光度(D)值,每个实验组设置5个复孔。另一96孔板于每个时间点拍照记录细胞状态的差异。

在检测补体系统对细胞增殖的影响实验中,加入10 μ mol/L补体C3活性抑制剂compstatin,并继续培养培养,72 h后加入CCK-8检测其细胞增殖能力。

1.2.2 IDO和COX-2表达检测 IDO的表达水平是评价MSCs免疫抑制能力的重要指标。该实验分别从RNA水平和蛋白水平检测hUCMSCs的IDO表达水平。将hUCMSCs种植于6孔板内,每孔种植 8×10^4 个细胞。待细胞贴壁后,加入细胞因子干扰素

γ (interferon gamma, IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),终浓度均为10 ng/mL。24 h后,分别收集RNA样品和蛋白样品,并利用Real time PCR和Western blot技术检测相关指标。

在检测补体系统对细胞免疫调控能力的影响实验中,加入10 μ mol/L补体C3活性抑制剂compstatin,并继续培养,24 h后收集蛋白样品使用Western blot技术对其细胞免疫抑制能力进行检测。

1.2.3 T细胞增殖实验 分离得到人PBMCs,使用含有1%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的PBS清洗2次,并用该PBS重悬PBMCs,使细胞密度控制在 4×10^7 个/mL;用含有1% FBS的PBS配制浓度为10 μ mol/L的CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)染色工作液,细胞悬液和CFSE染色工作液两者充分混匀以使染色液与细胞有效接触;将染色液孵育的细胞放在37 $^{\circ}$ C水浴锅中,染色10 min,期间每2 min拿出来混匀一次,以尽量确保染色液与细胞均匀接触;加入染色体积一半的FBS终止染色,4 $^{\circ}$ C避光孵育5 min;加入与染色液等体积的含有1% FBS的PBS清洗,混匀后,1 500 r/min、4 $^{\circ}$ C离心5 min,并重复此步骤一次;弃去上清,加入含有两种血清的RPMI培养基重悬细胞,计算细胞密度,种于48孔板。每孔种植 10^6 个细胞,1 mL体系。每种RPMI培养基设置4个复孔,2块48孔板分别为72 h和96 h时间点。其中,第一个孔为阴性对照,后3个复孔内加入2 ng/mL的human anti-CD3 antibody激活T细胞,促使T细胞进入细胞周期发生增殖。96 h后使用cyto-flex流式仪(贝克曼库尔特生物科技股份有限公司) FITC通道检测各组的CFSE信号,以评估各组T细胞的增殖情况。

1.2.4 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和补体成分(C3、C3a)的检测 获取热灭活前后的血清,分别使用BCA试剂盒和C3 ELISA试剂盒检测血清中的BSA含量和补体成分C3和C3a的活性。在BSA含量检测实验中,向孔板内加入20 μ L待检测血清,并加入BSA含量检测工作液200 μ L,在37 $^{\circ}$ C环境中孵育30 min后,使用BioTek仪器检测其在560 nm波长处的 D 值。在C3含量检测实验中,向ELISA吸附板内加入100 μ L待检测血清并室温孵育20 min。弃去样品,使用清洗液清洗3次并向每孔内加入带有酶联标记物的C3或C3a抗体,常温孵育20 min。弃去上清,加入TMB显色底物并在450 nm波长处检测 D 值。根据 D 值分别计算BSA和C3蛋白的含量。

1.2.5 数据分析 采用 *t* test对 CCK-8、CFSE 以及 ELISA 试剂盒检测结果数据进行统计分析, $P < 0.05$ 表示数据间存在统计学差异。采用 Two-Way ANOVA 对蛋白灰度值进行统计分析, $P < 0.05$ 表示数据间存在统计学差异。

2 结果与分析

2.1 hUCMSCs的形态观察

将MSCs种植于96孔板内,并在24 h、48 h、72 h 镜下观察细胞形态。如图1所示,两种血清培养下的细胞在各时间点的细胞形态均呈长梭型,细胞轮廓清晰,生长旺盛。24 h时两组细胞均成梭状结构;48 h时

两组细胞均发生显著增殖;72 h时细胞呈旋涡状并铺满整个孔板。以上数据显示血清热灭活对细胞形态没有影响。

2.2 CCK-8检测细胞增殖活力

由图2结果显示,两种血清培养的hUCMSCs细胞的生长曲线大致呈“S”形,包含潜伏期、对数生长期和平台期,24 h为潜伏期,48 h和72 h为对数生长期,96 h进入平台期。两组血清培养的细胞生长速率前期大致保持一致,并无区别。在生长中后期,与未热灭活组相比,热灭活血清组hUCMSCs的增殖速率显著提高。这些结果表明血清热灭活可以提高hUCMSCs的增殖速率。

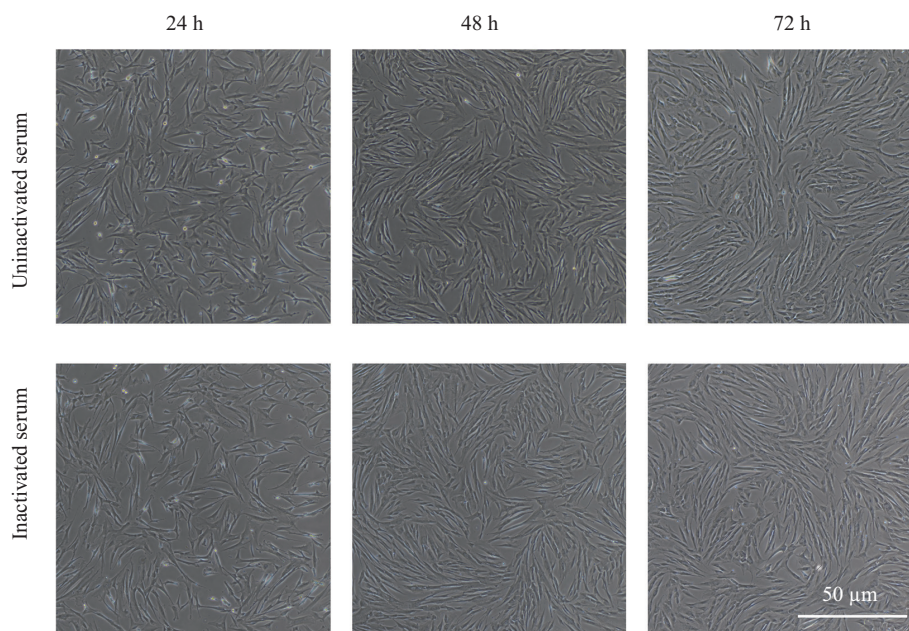


图1 未热灭活或热灭活血清条件培养下的间充质干细胞的形态比较

Fig.1 Comparison of cellular morphology of mesenchymal stem cells cultured with unactivated or heat-inactivated serum

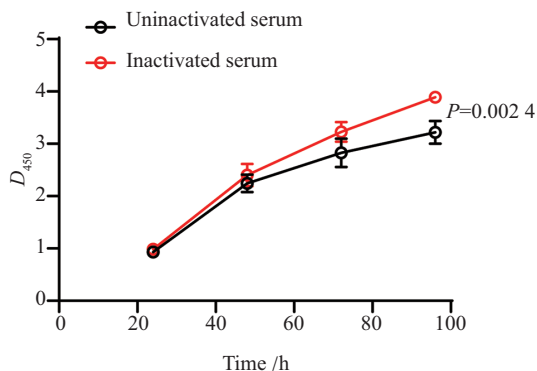


图2 热灭活血清对间充质干细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of heat-inactivated serum on proliferation of mesenchymal stem cells

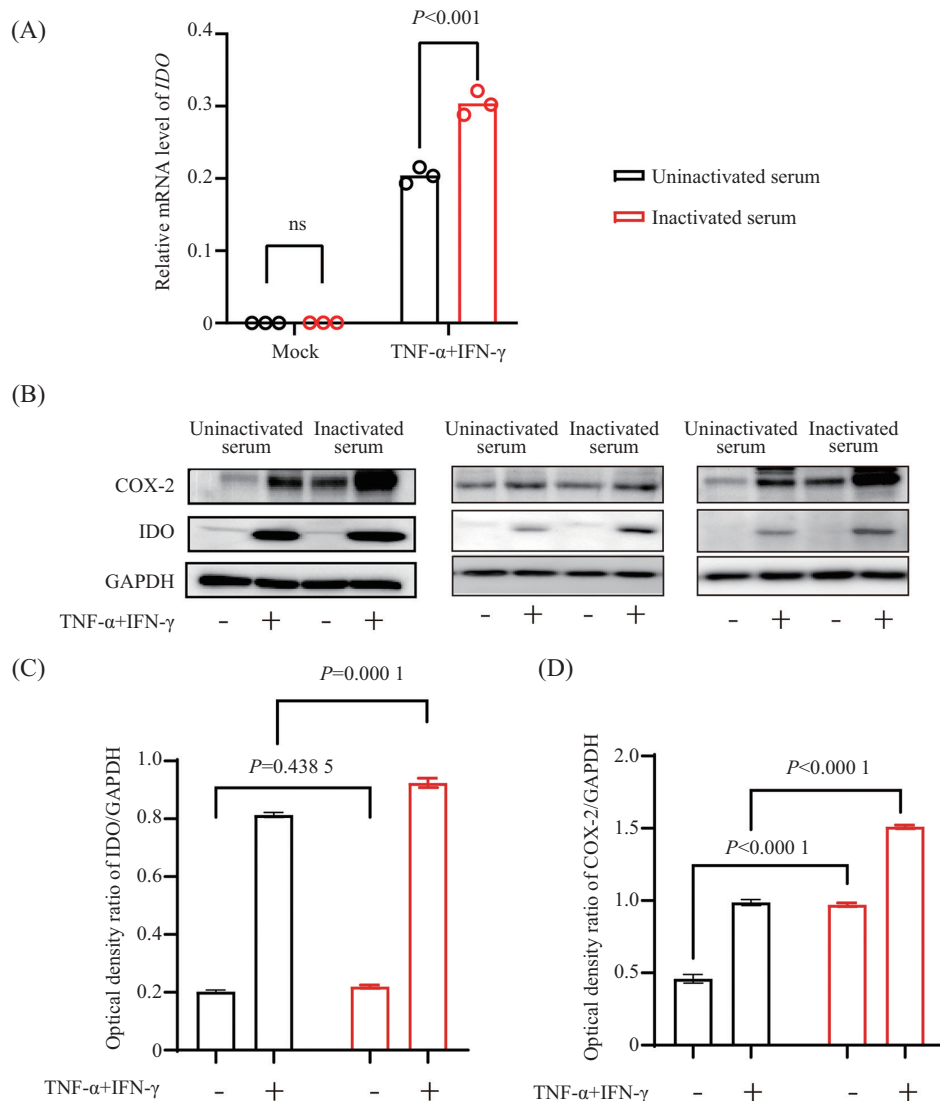
2.3 IDO表达检测

在炎症因子的刺激下, MSCs可以通过表达IDO和COX-2等效应分子产生免疫调控作用。IDO和COX-2的表达水平可以指示MSC的免疫调控能力。如图3中Western blot和Real time PCR的结果显示, 在正常情况下, 两种血清培养的细胞IDO蛋白表达含量都很低, 但在细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的刺激下, 两种处理组的细胞内IDO水平均显著上调, 但热灭活血清组中hUCMSCs的IDO蛋白表达量的上调幅度显著高于未热灭活血清组。正常状态下, 热灭活血

清组中hUCMSCs表达的COX-2蛋白水平显著高于未热灭活血清组, 在IFN- γ 和TNF- α 两种因子的刺激下, 热灭活血清组hUCMSCs中的COX-2蛋白进一步高于未热灭活血清组。综合以上结果表明, 热灭活血清能够增强hUCMSCs对炎症因子刺激的敏感性, 促进免疫调控因子IDO和COX-2的表达。

2.4 T细胞增殖

如图4所示, 选择活细胞群体后, 根据阴性对照(图4B), 圈出阳性增殖峰。由图4C可知, 未热灭活血清组T细胞增殖率约为35%; 热灭活血清组T细胞增



A: 利用Real time PCR研究未热灭活和热灭活血清对间充质干细胞中IDO基因表达量的影响。B~D: 利用Western blot分析比较未热灭活和热灭活血清培养条件下, 间充质干细胞中IDO和COX-2的表达量。

A: determine the expression level of *IDO* in MSCs treated by unactivated and heat-inactivated serum by Real time PCR. B-D: comparison of the *IDO* and *COX-2* expression levels of MSCs cultured with unactivated and heat-inactivated serum by Western blot.

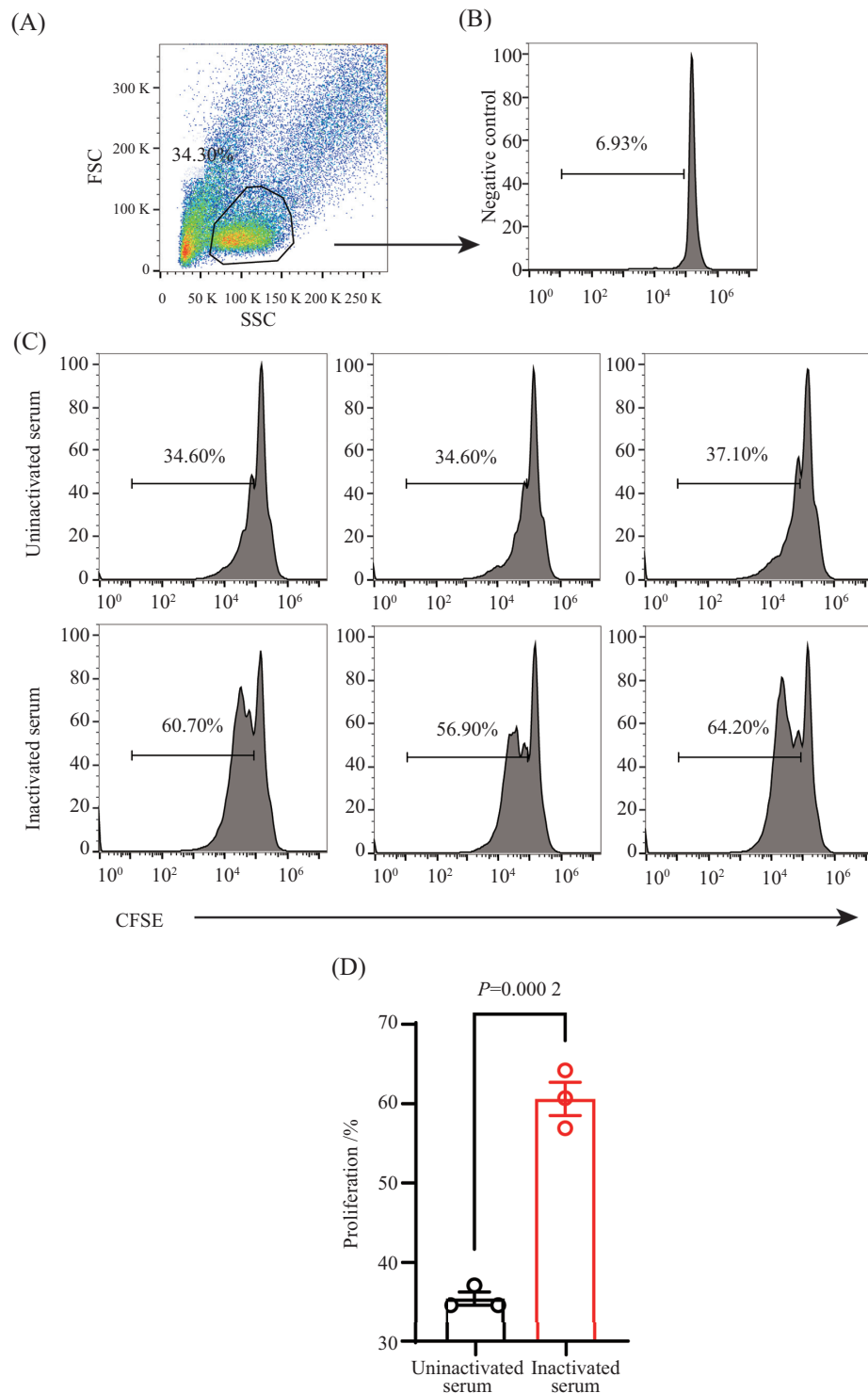
图3 未灭活和热灭活血清条件培养的间充质干细胞中的COX-2和IDO表达水平

Fig.3 Expression levels of immune regulation proteins COX-2 and IDO in mesenchymal stem cells cultured with unactivated or heat-inactivated serum contained medium

殖率约为60%, 热灭活血清组的T细胞增殖率显著高于未热灭活血清组(图4D)。以上结果表明, 热灭活血清能够提高T细胞的增殖效率。

2.5 牛血清白蛋白(BSA)和补体成分(C3)检测

BSA, 又称第五组分, 是牛血清中的一种白蛋白, 包含583个氨基酸残基。研究发现, 向无血清培

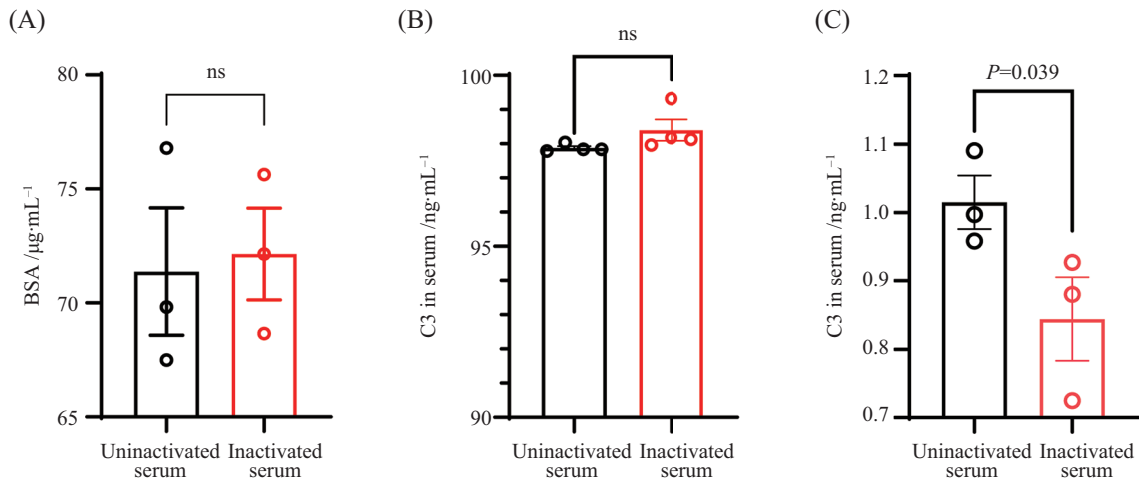


A: 使用流式细胞仪分析外周血中T淋巴细胞的增殖情况, 使用该圈门方法选择目的细胞。B: T淋巴细胞增殖的阴性对照。C、D: 在未灭活和热灭活血清的处理下, CFSE染色分析T淋巴细胞的增殖变化。

A: flow cytometry was used to analyze the proliferation of T lymphocytes in peripheral blood, and the target cells were selected by using the gate method. B: negative control of T lymphocytes proliferation. C,D: comparison of T lymphocytes proliferation treated by unactivated and inactivated serum.

图4 未灭活和热灭活血清条件培养的T淋巴细胞的增殖速率比较

Fig.4 Comparison of proliferation of T lymphocytes cultured by unactivated or heat-inactivated serum contained medium



A: 未热灭活和热灭活血清中BSA的含量变化。B: 未热灭活和热灭活血清中补体C3的含量变化。C: 未热灭活和热灭活血清中激活补体C3a的含量变化。

A: content of BSA in the uninactivated and heat-inactivated serum. B: content of complement C3 in the uninactivated and heat-inactivated serum. C: content of activated complement C3a in the uninactivated and heat-inactivated serum.

图5 热灭活前后的血清中BSA、C3以及C3a的定量分析

Fig.5 Quantitative analysis of BSA, C3 and C3a in uninactivated and heat-inactivated serum

培养基中添加BSA能够明显提高人淋巴细胞的增殖活性^[15]。由于热灭活血清能够明显提高细胞的增殖率,所以我们检测了热灭活前后血清内的BSA含量。数据显示,热灭活前后的血清中BSA的含量没有发生变化(图5A)。

补体系统是血清的重要组分,为了研究是什么导致了热灭活前后的血清对细胞增殖及免疫调控功能的不同,我们检测了热灭活前后血清中的补体含量。图5B显示,热灭活前后,血清中补体C3总量没有改变。补体C3a是补体C3激活后的重要存在形式。为此,我们使用试剂盒检测了热灭活前后血清中补体C3a的含量。数据显示,热灭活后的血清中C3a含量显著减少(图5C)。这些结果说明热灭活血清会降低补体系统的活性,但是不会改变总蛋白含量和补体总量。

2.6 C3活性抑制剂compstatin对细胞增殖和免疫抑制能力的影响

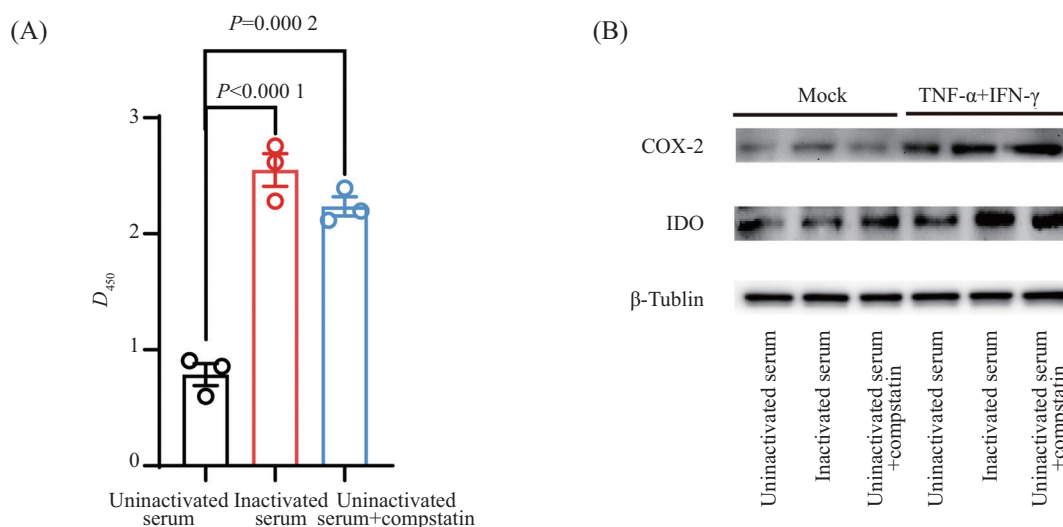
compstatin是一种补体抑制剂。compstatin能够结合C3,阻断C3转化酶蛋白水解切割形成C3a的过程,从而实现抑制C3活性的效应。所以我们在hUCMSCs的培养基中加入C3活性抑制剂compstatin,并检测细胞的增殖变化情况。如图6A所示,热灭活血清培养的细胞增殖速率显著高于未热灭活血清组。但未热灭活血清组在给予compstatin后,细胞增殖速率也能得到显著上升(图6A)。我们同样检测了

compstatin对hUCMSCs的免疫抑制功能的影响。结果显示,与未热灭活血清组相比较,compstatin同样显著上调了IDO和COX-2水平。这些结果说明抑制血清中补体C3的激活,可显著提高细胞的增殖速率和免疫抑制能力。

3 讨论

胎牛血清由于生长因子含量丰富,包括细胞增殖和维持所需的大多数因子的混合物,已经成为细胞培养基的标准补充剂^[16]。所以研究血清的处理方式是进行细胞研究的基础。

间充质干细胞可以从多种组织中,例如脐带、脂肪、骨髓等获得。其是一类具有多向分化潜能的干细胞,在组织损伤过程中能分化形成多种组织类型细胞,例如成纤维细胞、内皮细胞、角化细胞以及皮肤毛囊细胞等^[17-19]。除了分化形成各种功能细胞外,间充质干细胞还具有重要的免疫调控能力,在组织损伤过程中,间充质干细胞可以通过分泌多种炎症调控因子从而控制免疫细胞的浸润和增殖,继而抑制组织炎症,加速组织修复。热灭活血清处理对间充质干细胞的形态没有影响,但是能够显著提高间充质干细胞的增殖速率和免疫调控蛋白的表达水平,增强间充质干细胞的免疫调控潜能。以上结果表明,热灭活血清更利于干细胞的体外扩增培养和免疫调控效能的优化。



A: compstatin处理后, 使用CCK-8检测间充质干细胞的增殖变化。B: compstatin处理对间充质干细胞免疫调控蛋白COX-2和IDO的表达影响。
A: proliferation of hUCMSCs after compstatin administration. B: expression levels of COX-2 and IDO in hUCMSCs treated by compstatin.

图6 补体抑制剂处理后的血清对间充质干细胞增殖和免疫调控能力的影响

Fig.6 Effects of serum treated with complement inhibitors on the proliferation and immuno-regulation of mesenchymal stem cells

在我们的实验研究中发现热灭活血清并没有改变细胞的形态。而细胞形态的改变预示着干细胞的分化产生^[20]。所以我们可以推测热灭活处理后的血清并不会改变间充质干细胞的干性。使用热灭活血清培养的间充质干细胞可以用于干细胞研究。

除此以外, 热灭活的血清还可以提高间充质干细胞和外周血中T淋巴细胞的增殖速率, 这一功能可以满足干细胞和T淋巴细胞在进行体外研究中对细胞数量的要求。在临床试验中, 有研究人员进行了一项单中心、随机、双盲、安慰剂对照的I期临床试验, 在急性呼吸窘迫综合征患者中静脉注射同种异体脂肪来源间充质干细胞, 而细胞注射量高达 1×10^6 个/千克^[21]。使用热灭活血清体外培养干细胞可以提高hUCMSCs的增殖速率。热灭活血清条件培养的MSCs的快速增殖的特性可以短时间内实现临床治疗对高细胞量的要求。

间充质干细胞主要通过其分泌大量的免疫抑制分子, 如IDO、COX-2等实现其免疫抑制功能^[22]。热灭活后的血清能够显著提升间充质干细胞内IDO和COX-2的表达量, 这一特性更能发挥间充质干细胞的免疫抑制功能, 有利于间充质干细胞的体外功能研究。

在动物实验中, 有研究发现补体系统会抑制T细胞的增殖^[23]。胎牛血清中含有大量的补体, 热灭活血清中补体成分失活。热灭活血清提高了T细

胞的增殖速率, 这一结果与热灭活血清中的各种免疫补体失活相关。给予补体C3的活性抑制剂compstatin可显著提高未灭活血清培养的hUCMSCs的增殖速率和免疫调控能力, 这一结果也印证了上述结论。有研究指出, 补体C1q可以极化巨噬细胞和树突状细胞, 使其高表达PD-L1和PD-L2, 抑制细胞表面CD40的表达。补体C1q刺激极化后的巨噬细胞和树突状细胞能够减弱异体或自体Th17和Th1亚群的增殖能力^[23]。而在体外培养过程中, 补体系统如何影响细胞增殖速率的具体分子机制仍不清晰, 需要进一步的研究。

本研究发现热灭活处理的血清能够优化体外细胞培养程序, 提升所培养细胞的功能。使用热灭活处理的血清不影响hUCMSCs的干性, 却能够提高hUCMSCs和PBMCs的增殖速率。不仅如此, 热灭活血清还能通过灭活补体系统增强hUCMSCs的免疫调控能力。热灭活的血清通过灭活血清内的补体成分从而提高hUCMSCs和PBMCs的增殖速率, 并增强了hUCMSCs的免疫抑制功能。所以, 我们建议在细胞实验中可以使用热灭活的血清培养细胞。

参考文献 (References)

- [1] KIM K, THORP H, BOU-GHANNAM S, et al. Stable cell adhesion affects mesenchymal stem cell sheet fabrication: effects of fetal bovine serum and human platelet lysate [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14(5): 741-53.

- [2] YILMAZ M, OVALI E, AKDOGAN E, et al. Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells [J]. *Saudi Med J*, 2008, 29(2): 306-9.
- [3] TRIGLIA R P, LINSKOTT W D. Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera [J]. *Mol Immunol*, 1980, 17(6): 741-8.
- [4] NISHIOKA K, LINSKOTT W D. Components of guinea pig complement. i. separation of a serum fraction essential for immune hemolysis and immune adherence [J]. *J Exp Med*, 1963, 118 (5): 767-93.
- [5] LEE D E, AYOUB N, AGRAWAL D K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, doi: 10.1186/s13287-016-0303-6.
- [6] ZHU M, CHU Y, SHANG Q, et al. Mesenchymal stromal cells pretreated with pro-inflammatory cytokines promote skin wound healing through VEGFC-mediated angiogenesis [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(10): 1218-32.
- [7] SCHWEIZER R, KAMAT P, SCHWEIZER D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner [J]. *Cytherapy*, 2014, 16(10): 1345-60.
- [8] SCHLOSSER S, DENNLER C, SCHWEIZER R, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin [J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 267-75.
- [9] PINYOPUMMINTR T, BAVISTER B D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation [J]. *Theriogenology*, 1994, 41(6): 1241-9.
- [10] HU X, AN T, SITU B, et al. Heat inactivation of serum interferes with the immunoanalysis of antibodies to SARS-CoV-2 [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(9): e23411.
- [11] BARNUM S R, NIEMANN M A, KEARNEY J F, et al. Quantitation of complement factor D in human serum by a solid-phase radioimmunoassay [J]. *J Immunol Methods*, 1984, 67(2): 303-9.
- [12] FAGIOLO U, KRICEK F, RUF C, et al. Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106(3): 567-72.
- [13] GIARD D J. Routine heat inactivation of serum reduces its capacity to promote cell attachment [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1987, 23(10): 691-7.
- [14] SHI Y, HU G, SU J, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair [J]. *Cell Res*, 2010, 20(5): 510-8.
- [15] HAN Y, YANG J, FANG J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 92.
- [16] LIU X, LANG Q, WU M, et al. Screening high-quality fetal bovine serum for porcine oocyte maturation *in vitro* [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(4): 334-9.
- [17] MARTIN P, NUNAN R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing [J]. *Br J Dermatol*, 2015, 173(2): 370-8.
- [18] SASAKI M, ABE R, FUJITA Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type [J]. *J Immunol*, 2008, 180(4): 2581-7.
- [19] ISHII G, SANGAI T, ITO T, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(2): 212-20.
- [20] ZHANG Z, ZHENG T, ZHU R. Microchip with single-cell impedance measurements for monitoring osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells under electrical stimulation [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(18): 12579-87.
- [21] ZHENG G, HUANG L, TONG H, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 39.
- [22] 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.
- [23] CLARKE E V, WEIST B M, WALSH C M, et al. Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1): 147-60.