

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.003 [http://www.crter.org]

周峰, 王英振, 张海宁, 吕成昱, 续宗耀. 人软骨细胞培养上清诱导脐血间充质干细胞向软骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7034-7039.

人软骨细胞培养上清诱导脐血间充质干细胞向软骨细胞分化***

周峰, 王英振, 张海宁, 吕成昱, 续宗耀(青岛大学医学院, 山东省青岛市 266003)

文章亮点:

1 文章联合应用密度梯度离心和细胞贴壁法, 成功从脐血中提取并培养人脐血间充质干细胞, 利用人体透明软骨细胞培养上清对其进行诱导 2 周后, II 型胶原免疫组化结果显示部分细胞 II 型胶原表达阳性, 证实已分化为软骨细胞。

2 软骨细胞培养上清中含有多种成分, 但具体是哪种成分在起诱导作用? 尚需进一步的研究论证。而且在这种诱导条件下脐血间充质干细胞所分化的软骨细胞能否培养成软骨组织? 组织结构是否与人体软骨组织相同或类似? 这些都需要进一步研究揭示。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 脐血间充质干细胞; 软骨细胞; 上清; 诱导; II 型胶原; 分化; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 软骨细胞; 胶原, II 型; 离心法, 梯密度

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81171774, 81272056)**

摘要

背景: 人脐血间充质干细胞作为软骨缺损修复的种子细胞日益受到关注, 现有常用诱导方法无论是应用诱导培养基还是诱导因子, 因其价格昂贵、用量大等因素限制了实际应用。

目的: 验证人软骨细胞培养上清诱导人脐血间充质干细胞向软骨细胞分化的可行性。

方法: 利用密度梯度离心法和贴壁培养法分离新生儿脐血, 获取并培养人脐血间充质干细胞, 流式细胞仪鉴定细胞表面抗原。切取股骨头置换或全髋关节置换患者透明软骨组织, 体外分离培养软骨细胞, 利用其培养上清培养人脐血间充质干细胞, 培养 2 周后观察细胞表型外观变化, 免疫组化染色检测 II 型胶原表达结果。

结果与结论: 密度梯度离心法与贴壁培养法可以分离获取人脐血间充质干细胞, 流式细胞仪鉴定表面标记 CD90, CD105 高表达, 不表达 CD34, CD45。软骨细胞培养上清诱导 2 周后, 人脐血间充质干细胞向多角形、圆形转变, II 型胶原免疫组化检测表达阳性。提示软骨细胞培养上清可诱导人脐血间充质干细胞表达 II 型胶原, 向软骨细胞分化。

Differentiation of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells into chondrocytes induced by supernatants of human chondrocytes

Zhou Feng, Wang Ying-zhen, Zhang Hai-ning, Lü Cheng-yu, Xu Zong-yao (Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells have been used as seed cells to repair cartilage defects. Their application has been greatly limited by high cost and sufficient amount although they could be cultured in induced medium or induction factors.

OBJECTIVE: To verify the feasibility to induce human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells to differentiate into the chondrocytes using supernatants of human chondrocytes.

METHODS: Human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells were separated with density gradient centrifugation and adherent method from human umbilical cord blood. Surface markers of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells were identified by flow cytometry. Human hyaline cartilage was dissected, digested, and chondrocytes were cultured *in vitro*. The human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells were cultured with supernatant from chondrocytes. After 2 weeks, the changes of phenotype of the cells were identified, and type II collagen expression was detected using immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: Human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells were isolated from umbilical cord blood using density gradient centrifugation and adherent method. Flow cytometry demonstrated that the human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells expressed CD90 and CD105 positively, failed to express CD34 or CD45. After 2 weeks of induction, human umbilical cord blood

周峰★, 男, 1987 年生, 山东省泰安市人, 汉族, 2013 年青岛大学毕业, 硕士, 主要从事软骨的缺损与修复研究。

yuyenongcha@163.com

通讯作者: 张海宁, 副主任医师, 青岛大学医学院, 山东省青岛市 266003

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344
(2013)40-07034-06

收稿日期: 2013-02-06

修回日期: 2013-02-21

(20121218008/G · A)

Zhou Feng★, Master, Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China
yuyenongcha@163.com

Corresponding author: Zhang Hai-ning, Associate chief physician, Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Received: 2013-02-06

Accepted: 2013-02-21

derived-mesenchymal stem cells turned to polygon and round shaped. Immunohistochemistry staining showed some human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells expressed type II collagen. Results indicate that culture medium of chondrocytes can induce human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells to express type II collagen, and differentiate into the chondrocytes.

Subject headings: stem cells; chondrocytes; collagen type II; centrifugation, density gradient

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171774*, 81272056*

Zhou F, Wang YZ, Zhang HN, Lü CY, Xu ZY. Differentiation of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells into chondrocytes induced by supernatants of human chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40):7034-7039.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一种全能干细胞, 为中胚层发育的早期细胞, 具有多向分化的潜能。在一定条件诱导下, 可分化为成骨细胞、软骨细胞等^[1-2], 是组织工程理想的种子细胞。软骨组织工程应用较多的种子细胞是软骨细胞和骨髓间充质干细胞, 但是由于组织来源、取材和伦理等问题, 限制了它们作为软骨修复种子细胞的发展^[3-5], 故急需一种新的种子细胞来替代骨髓间充质干细胞, 并弥补其缺陷。近年来脐血作为骨髓的替代来源逐渐成为新的研究热点^[6-7], 受到国内外专家学者的青睐。

人脐血是胎儿娩出、脐带结扎并离断后残留在胎盘和脐带中的血液, 一般是作为废弃物丢弃的。但近年来的研究表明脐血中含有丰富的造血干细胞和间充质干细胞, 其中间充质干细胞具有多项分化潜能。

文章从脐血中分离培养出人脐血间充质干细胞, 并应用人体软骨细胞培养上清成功诱导脐血间充质干细胞表达 II 型胶原, 成功向软骨细胞分化。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 干细胞体外诱导分化实验。

时间及地点: 于 2011 年 9 月至 2012 年 3 月在青岛大学医学院附属医院中心实验室完成。

材料: 正常足月儿新鲜脐血取自青岛大学医学院附属医院妇产科分娩产妇, 股骨头表面软骨取自青岛大学医学院附属医院关节外科行股骨头置换或全髋关节置换患者, 供者对实验方案均知情同意, 且得到医院伦理委员会批准。

人软骨细胞培养上清诱导脐血间充质干细胞向软骨细胞分化实验的试剂:

试剂	来源
DMEM/F12、胎牛血清、胰酶	Hyclone
CD 抗体	ABcam
兔抗人 II 型胶原蛋白一抗、鼠抗兔二抗	Boster

方法:

人脐血间充质干细胞的分离与培养: 产妇签署知情同意后, 取正常足月儿新鲜脐血, 肝素抗凝, 加入等量 PBS 稀释, 离心管中加入 Percoll 液 (1.077 g/mL), 按 1:1 比例缓慢将稀释的脐血加到 Percoll 液中, 2 000 r/min 离心 30 min, 吸管吸取中间层白色絮状物, PBS 洗涤, 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 沉积细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基稀释, 细胞计数, 以 10^9 L^{-1} 的细胞浓度接种到培养瓶中, 细胞贴壁法进行细胞培养, 待细胞生长到 80% 融合后, 常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 观察细胞生长情况。

细胞表面标记测定: 常规胰蛋白酶消化第 3 代细胞, 反复吹打均匀, 细胞计数浓度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 加入 CD34, CD45, CD90, CD105 相应抗体, 室温孵育 30 min, 应用流式细胞仪检测细胞表型, 确定所培养细胞为人脐血间充质干细胞。

人软骨细胞的分离与培养: 经股骨头置换或全髋关节置换患者同意, 切取股骨头表面软骨部分, 无菌条件下修剪成 0.5 mm × 0.5 mm 大小碎片, PBS (含青、链霉素各 100 U/mL) 冲洗 3 遍, 加入 3 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶, 37 °C 恒温振荡器内消化 30 min; 取出标本, 弃去胰蛋白酶液体, 止胰消化; 加入 3 倍体积的 0.2% II 型胶原酶, 37 °C 恒温摇床内消化 8-12 h。见大部分软骨被消化后, 500 r/min 离心 5 min 使未被消化的软骨块沉淀。取上清液, 1 200 r/min 离心 10 min, 沉淀细胞以 PBS 洗 3 次, 洗去细胞表面的消化酶。加入体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养液进行培养。待细胞生长到 80% 融合后, 常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 观察细胞生长情况。

诱导培养: 收集软骨细胞 P2 以后培养上清, 加入到人脐血间充质干细胞中。间充质细胞隔天换液, 换液时按 1:1 加入软骨细胞培养上清和含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 观察间充质细胞形态变化。

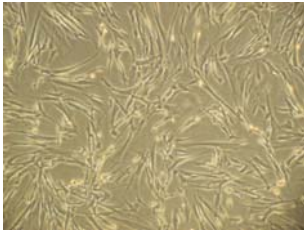
II 型胶原免疫组化检测: 将诱导组作为实验组, 常规培养组作为对照组, 分别诱导培养 2 周进行细胞爬片, 24 h 后 PBS 冲洗, 3 g/L 多聚甲醛固定, 4 °C 过夜。0.5% Triton 温育, 修复液中 95 °C 修复 15 min, 血清封闭后, 加 1:50 稀释浓度兔抗人 II 型胶原蛋白一抗

(Boster公司)4 ℃过夜, PBS清洗, 加入鼠抗兔二抗(Boster公司), 经DAB显色剂, 苏木精复染, 树胶封固, 显微镜下观察。

主要观察指标: 观察脐血间充质干细胞及软骨细胞的生长状态, 诱导后脐血间充质干细胞的形态变化, 以及II型胶原的表达情况。

2 结果 Results

2.1 人脐血间充质干细胞生长形态 细胞贴壁培养3 d首次半量换液, 镜下观察有梭形细胞贴壁生长, 随后细胞数目迅速增长, 逐渐呈现聚集状态。换液后3 d生长较慢, 生长速度从第7天开始迅速增加。第12天人脐血间充质干细胞首次达到80%融合。第2-7代细胞五六天即达到80%融合并可进行传代, 镜下可见漩涡状密集生长细胞, 见图1。P8以后细胞生长速度下降, 而且镜下开始出现死亡细胞。



注: 镜下可见人脐血间充质干细胞呈漩涡状密集生长。

图1 第2代人脐血间充质干细胞的生长形态(×100)

Figure 1 Growth of second generation of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells (×100)

2.2 细胞表面标记测定 见图2。

流式细胞仪检测结果显示, 第3代细胞高表达CD90, CD105, 不表达造血干细胞表面标记CD34, CD45, 确定所培养细胞为脐血间充质干细胞。

2.3 人软骨细胞的生长形态 原代细胞24 h即可贴壁, 细胞以圆形居多, 也有部分多角形, 见图3; 48 h细胞开始增殖, 细胞形态变化不大; 72 h细胞胞浆增多, 圆形细胞延伸, 多角形细胞增多; 96 h即达80%融合, 可行细胞消化传代。

2.4 诱导培养结果 软骨细胞培养上清加到人脐血间充质细胞培养基后, 开始10 d细胞形态无明显变化, 随后细胞胞浆增多, 细胞由梭形向多角形、圆形转化, 见图4。

2.5 II型胶原免疫组化检测结果 诱导培养2周, 行II型胶原免疫组化检测, 镜下观察实验组人脐血间充质干细胞, 均可见部分细胞胞浆呈棕黄色, II型胶原蛋白表达阳性, 见图5。

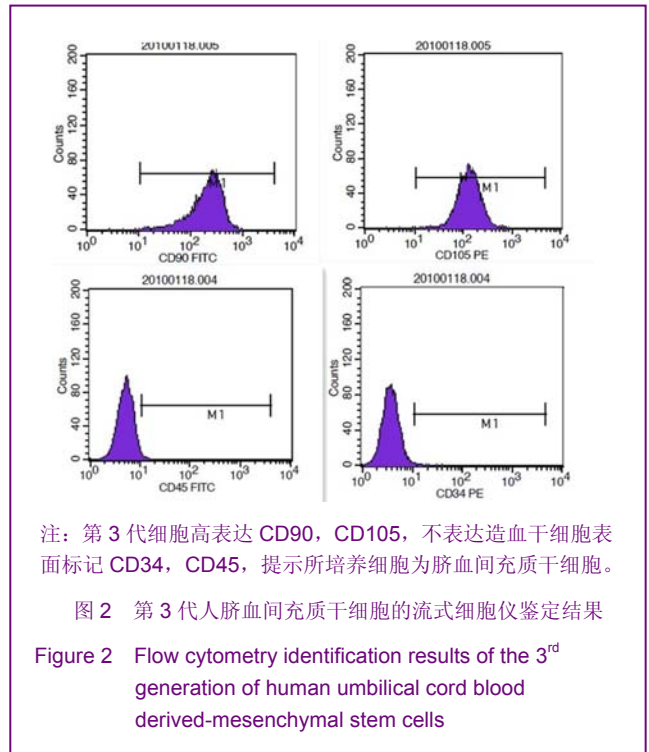


图2 第3代人脐血间充质干细胞的流式细胞仪鉴定结果

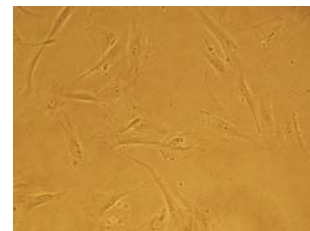
Figure 2 Flow cytometry identification results of the 3rd generation of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells



注: 原代人软骨细胞培养24 h时, 细胞贴壁呈短梭状、多角形生长。

图3 原代人软骨细胞培养24 h的生长形态(×100)

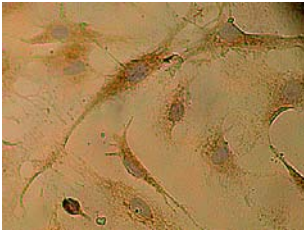
Figure 3 Growth appearance of primary human chondrocytes after cultured for 24 h (×100)



注: 软骨细胞培养上清加到人脐血间充质细胞培养基诱导培养10 d后, 光镜下可见脐血间充质细胞向多角形、圆形转变。

图4 人软骨细胞培养上清对脐血间充质细胞的诱导培养情况(×200)

Figure 4 Induced culture of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells in supernatant from chondrocytes (×200)



注: 镜下观察, 人软骨细胞培养上清诱导的人脐血间充质干细胞可见部分细胞胞浆呈棕黄色, 提示 II 型胶原蛋白表达阳性。

图 5 人软骨细胞培养上清诱导 2 周后脐血间充质细胞的 II 型胶原免疫组化观察结果($\times 200$)

Figure 5 Type II collagen immunohistochemistry of human umbilical cord blood derived-mesenchymal stem cells after culture in supernatant from chondrocytes for 2 wk ($\times 200$)

3 讨论 Discussion

关节软骨无血管供应, 仅依靠关节腔内关节液提供营养, 当有缺损时, 关节软骨的自我恢复能力很差。一旦软骨无法修复, 很容易造成创伤性关节炎或骨性关节炎。骨性关节炎已成为威胁人类健康的主要疾病之一。目前临床上尚无特效的治疗方法, 软骨损伤后各种外科治疗如清创、钻孔减压、骨膜移植和自体软骨细胞移植术等, 虽能暂时缓解疼痛但最终也会失败^[8]。组织工程学的兴起为软骨损伤修复带来了新的希望。组织工程学主要涉及到 3 个方面: 种子细胞、生长因子、支架材料, 其中种子细胞是关键, 也是研究者关注的重点。骨组织的修复与重建是一个动态变化的过程, 包括基质、细胞、周围环境的相互作用, 尽管每个组成都会对最终结果造成影响, 但经常独立研究每个组成。骨组织工程作为一项突破性技术, 最有价值的是间充质干细胞的介入。研究最广的是骨髓源间充质干细胞^[9]。

多项研究表明, 骨髓来源的间充质干细胞可以定向分化为软骨细胞, 修复软骨缺损^[10-11]。但是骨髓间充质干细胞由于取材、安全性、伦理等问题限制了其应用。同时有研究表明, 随着年龄的增加, 骨髓中所含有的间充质干细胞减少, 受病毒感染的机会增加^[12]。脐血间充质干细胞是近几年发现的一类与骨髓相同的多向分化潜能的原始细胞, 具有很强的定向分化和增殖能力^[13]。脐血作为医院的废弃材料, 脐血间充质干细胞获取的侵袭性小^[14], 不会对母婴双方造成伤害^[15]。现有学者证实脐血中不含有肿瘤细胞^[16], 安全性较高。自 2000 年 Erices 等^[17]首次从脐血中分离培养出间充质样细胞起, 研究者就给予了足够的重视。目前脐血间充质干细胞已成为国内外研究的热点。人脐血间充质干细胞的研究尚

处于起步阶段, 主要的研究方向还在分离培养、细胞鉴定、诱导分化等^[18]。现阶段, 应用较多的分离方法主要为密度梯度离心法、细胞贴壁法、免疫磁珠法、流式细胞分离法、单细胞克隆技术等^[19]。综合考虑材料、费用等问题, 研究人员主要倾向于密度梯度离心和细胞贴壁法联合应用。文章也以该联合方法成功从脐血中分离出人脐血间充质干细胞, 进一步证明这种分离方法的可行性。

妊娠期、脐血量、存储时间是影响脐血间充质干细胞分离成功的因素^[20], 研究表明妊娠期 < 37 周^[21], 脐血体积 > 80 mL, 储存时间 < 6 h, 能够较好的分离获得脐血间充质干细胞。有研究表明应用抗 CD271, CD133 免疫磁珠可以高效的选择出间充质干细胞^[22], 对于培养条件尚无统一意见, 有研究者认为体积分数 15% 胎牛血清是最适培养浓度^[23], 但也有人指出自体血清培养效果比胎牛血清好^[24]。同时也有研究应用体积分数 10% 胎牛血清的 IMDM, 加入细胞活性因子: 15 μ g/L 白细胞介素 3、5 μ g/L 粒-巨噬细胞集落刺激因子, 有效培养原代脐血间充质干细胞^[25]。同时 γ -干扰素能够影响脐血间充质干细胞显型, 加强免疫调节性^[26], 前列腺素能够促进脐血间充质干细胞增殖^[27]。研究发现通过氧化反应能够调控脐血间充质干细胞的增殖和死亡^[28], 低氧环境有利于体外细胞培养^[29]。

在干细胞的多项分化潜能方面报道结果并不统一。有研究对比了骨髓源、脂肪源与脐血源间充质干细胞, 得出不同的结论: Zhang 等^[23]认为脐血间充质干细胞有很强的生存能力, 但增殖能力较低, 但 Kern 等^[30]却认为脐血间充质干细胞能够培养时间最长, 有最强的增殖能力, 令人震惊的是脐血间充质干细胞不能向脂肪分化。

目前报道的脐血间充质干细胞表面标记表达阳性的有 SH2、SH3、CD29、CD44、CD54、CD71、CD73、CD90、CD105、CD105、CD106、CD120a、CD124、CD166 等^[31-32], 不表达造血干细胞表面标记的有 CD13、CD14、CD34、CD40、CD45、CD80、CD86、CD117、HLA-DR 等^[33]。但是脐血间充质干细胞并无特异性标记, 造血干细胞的特征性标记 CD34、CD45 的表达差异将脐血间充质干细胞同造血系细胞区别开来^[34]。最新研究表明, 可将线性 poly-N-acetyllactosamine 作为脐血间充质干细胞的新标记^[35]。本实验细胞表面标记流式细胞鉴定结果 CD34、CD45 表达阴性, CD90、CD105 高表达, 进一步说明所获取的细胞为脐血间充质干细胞。

国内外多项研究表明体外诱导脐血间充质干细胞, 可使其分化为软骨细胞^[36]。不同研究者所使用的体外诱导剂有所不同。有报道胰岛素样生长因子诱导 16 d 后, 脐血间充质干细胞开始呈现软骨细胞特点, 也有联合应用转化生长因子 $\beta 1$ 和胰岛素样生长因子 1 及高糖 DMEM 进行诱导培养, 21 d 特异性表达 II 型胶原^[37]。有研究者

应用诱导软骨细胞培养基诱导脐血间充质干细胞后^[38], 扫描电子显微镜检测诱导细胞具有软骨细胞形态学特征。也有研究者应用成软骨诱导剂, 含有转化生长因子 β 、胰岛素、地塞米松、转铁蛋白、维生素C、H-DMEM培养基, 同样达到良好的诱导效果。也有研究者应用血小板裂解液诱导脐血间充质干细胞向软骨细胞分化, 指出单独应用血小板裂解液不能诱导脐血间充质干细胞向软骨细胞分化, 但是能提高体外向软骨细胞分化的能力^[39]。

如何判断间充质干细胞分化程度, 分化为何种细胞也是现在的研究热点。有研究表明, CD73, CD90, CD105与细胞分化程度有关^[20], 同时建议将CD90作为干细胞分化的示踪标记, 同时有报道间充质干细胞表面CD105含量为(99.4 \pm 0.1)%, 但是在成骨细胞中为(3.5 \pm 1.4)%, 软骨细胞为(3.5 \pm 2.3)%, 脂肪细胞为(16.7 \pm 3.6)%, 有明显差异^[40]。现在多数研究者则以II型胶原是否表达来判断诱导成功与否。II型胶原是软骨细胞含量最多的成分, 也是其特征性指标^[41], 所以一般作为软骨细胞的判断标准。

现有常用诱导方法无论是应用诱导培养基还是诱导因子, 因其价格昂贵、用量大等因素限制了实际应用。因此有研究者提出应用软骨细胞与人脐血间充质干细胞共同培养诱导分化^[42], 结果表明部分间充质干细胞向软骨细胞分化, 并继续存活。但具体是软骨细胞起诱导作用还是其分泌成分起作用尚不得而知。文章联合应用密度梯度离心和细胞贴壁法成功从脐血中提取培养人脐血间充质干细胞, 其呈纤维样细胞生长, 符合以往有关人脐血间充质干细胞的报道。利用人体透明软骨细胞培养上清对脐血间充质干细胞进行诱导培养, 结果在诱导2周后, II型胶原免疫组化结果显示部分细胞II型胶原表达阳性, 证实细胞已分化为软骨细胞。

应用人体软骨细胞培养上清对脐血间充质干细胞进行培养诱导, 结果显示这种诱导方法的可行性。软骨的损伤愈合是极其复杂的过程, 需要多种因素参与。在对骨髓间充质干细胞的研究中发现骨髓间充质干细胞要想充分向软骨细胞分化, 必须处在一种软骨环境中, 因此关节软骨环境对于骨髓间充质干细胞分化成软骨细胞具有一定的作用。软骨环境中必然存在一些促进分化的物质, 研究发现软骨细胞可分泌多种生长因子, 如胰岛素样生长因子、转化生长因子等。软骨细胞培养上清中含有软骨细胞分泌的因子, 可以说是一种软骨环境, 能够促进间充质干细胞向软骨细胞分化。脐血间充质干细胞作为替代骨髓间充质干细胞的种子细胞, 具有与其相似的分化潜能和分化特性。可以推测在软骨环境中能够促进脐血间充质干细胞向软骨细胞分化, 实验结果也证实了这种猜想。软骨细胞培养上清中含有多种成分, 但具体是哪种成分起诱导作用, 尚需进一步的实验论证。而且在这种诱导条件下脐血间充质干细胞所分化

的软骨细胞能否培养成软骨组织, 组织结构是否与人体软骨组织相同或类似都需要进一步研究。

致谢: 感谢青岛大学医学院附属医院中心实验室及干细胞培养中心的大力支持。

作者贡献: 由第一作者完成实验, 其余作者进行相关指导, 实验采用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 所有标本供者对实验过程完全知情同意, 在充分了解实验方案的前提下签署“知情同意书”; 干预及治疗方案获医院伦理委员会批准。

学术术语: 脐血间充质干细胞-脐血中含有丰富的造血干细胞和间充质干细胞, 其中间充质干细胞具有多项分化潜能。脐血间充质干细胞是近几年发现的一类与骨髓相同的多向分化潜能的原始细胞, 具有很强的定向分化和增殖能力。脐血间充质干细胞获取的侵袭性小, 不会对母婴双方造成伤害。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD, et al. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J.* 2006;20(7):950-952.
- [2] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004;103(5):1669-1675.
- [3] Rao J, Shen J, Quan D, et al. Property studies on three-dimensional porous blended silk scaffolds. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2009;23(10):1264-1270.
- [4] Huang Y, Dai ZQ, Ling SK, et al. Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2009;16:87.
- [5] Schulze-Tanzil G, Mobasher A, de Souza P, et al. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(6):448-458.
- [6] Secco M, Zucconi E, Viera NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008;26:146-150.
- [7] Secco M, Zucconi E, Viera NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008;26:146-150.
- [8] 蓝孝同, 王英振. 骨髓间充质干细胞治疗骨性关节炎的研究进展[J]. *齐鲁医学杂志*, 2010, 25(2):186-188.
- [9] Szpalski C, Barbaro M, Saqebin F, et al. Bone tissue engineering: current strategies and techniques—part II: Cell types. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18(4):258-269.
- [10] 于艳秋, 任海琴, 云伟, 等. 人类脐血来源的间充质干细胞向软骨和成骨细胞分化的实验研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(6):1385-1389.

- [11] 解继胜, 黄海玲, 唐毓金, 等. 人脐带血间充质干细胞分离培养及向软骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(16): 3065-3068.
- [12] Au A, Boehm CA, Mayes AM, et al. Formation of osteogenic colonies on well-defined adhesion peptides by freshly isolated human marrow cells. *Biomaterials*, 2007, 28(10): 1847-1861.
- [13] Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord stem/progenitor cells. *Cells Prolif*. 2011; 44:55-59.
- [14] Fonseka M, Ramasamy R, Yip WK, et al. Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells (hUCB-MSC) Inhibits the Proliferation of K562 (Human Erythromyeloblastoid Leukemic Cell Line). *Cell Biol Int*. 2012. [Epub ahead of print]
- [15] Kim JS, Lee HK, Kim MR, et al. Differentially expressed proteins of mesenchymal stem cells derived from human cord blood (hUCB) during osteogenic differentiation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(9): 2309-2317.
- [16] Gennery AR, Cant AJ. Cord blood stem cell transplantation in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007; 7(6): 528-534.
- [17] Erices A, Conget P, Mingudl JJ, et al. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000; 109: 235-242.
- [18] Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*. 2010; 3: 248-269.
- [19] Mohyeddin Bonab MA, Alimoghaddam KA, Goliaei ZA, et al. Which factors can affect cord blood variables? *Transfusion*. 2004; 44(5): 690-693.
- [20] Sibov TT, Severino P, Marti LC, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*. 2012; 64(5): 511-521.
- [21] Ma LL, Meng FB, Shi P, et al. Quantity and proliferation rate of mesenchymal stem cells in human cord blood during gestation. *Cell Biol Int*. 2012; 36(4): 415-418.
- [22] Liu QH, Ge J, Liu KY. Are CD133 and CD271 useful in positive selection to enrich umbilical cord blood mesenchymal stem cells? *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2010; 18(5): 1286-1291.
- [23] Zhang H, Li A, Rao GZ, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood and its bone inducing activity in vitro. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2010; 19(3): 290-295.
- [24] Zhang Y, Wang L, Yang M, et al. Experimental study on culture of human mesenchymal stem cells from cord blood using autologous serum *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2008; 25(5): 1155-1160.
- [25] Fan X, Liu T, Liu Y, et al. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog*. 2009; 25(2): 499-507.
- [26] Rong LJ, Chi Y, Yang SG, et al. Effects of interferon- γ on biological characteristics and immunomodulatory property of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012; 20(2): 421-426.
- [27] Jang MW, Yun SP, Park JH, et al. Cooperation of Epac1/Rap1/Akt and PKA in prostaglandin E(2)-induced proliferation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells: involvement of c-Myc and VEGF expression. *J Cell Physiol*. 2012; 227(12): 3756-3767.
- [28] Ko E, Lee KY, Hwang DS. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(11): 1877-1886.
- [29] Laitinen A, Nystedt J, Laitinen S. The isolation and culture of human cord blood-derived mesenchymal stem cells under low oxygen conditions. *Methods Mol Biol*. 2011; 698: 63-73.
- [30] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; 24(5): 1294-1301.
- [31] Gong W, Han Z, Zhao H, et al. Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cell Transplant*. 2012; 21(1): 207-216.
- [32] 邹叶青, 贺文凤, 石庆之, 等. 骨髓与脐带血间充质干细胞的生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究与临床研究, 2008, 12(21): 4141-4143.
- [33] 高杨, 李立, 冉江华, 等. 两种分离脐带血间充质干细胞的方法比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19): 3472-3475.
- [34] 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. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317.
- [35] Hirvonen T, Suila H, Kotovuori A, et al. The i blood group antigen as a marker for umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(3): 455-464.
- [36] Yu Y, Ren H, Yun W, et al. Differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into chondroblasts and osteoblasts. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2008; 25(6): 1385-1389.
- [37] 农丕地, 解继胜, 黄海玲. 体外诱导人脐带血间充质干细胞为软骨细胞的初步研究[J]. 右江民族医学院学报, 2007, 29(5): 689-691.
- [38] Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*. 2007; 23(2): 178-187.
- [39] Fenq X, Tian S, Sun K, et al. Effect of platelet lysate on chondrogenic differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011; 25(10): 1250-1255.
- [40] Jin HJ, Park SK, Oh W, et al. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 381(4): 676-681.
- [41] Blain EJ. Mechanical regulation of matrix metalloproteinases. *Front Biosci*. 2007; 12: 507-527.
- [42] 李丽艳, 杜江, 黄金中. 兔软骨细胞诱导人脐带血间充质干细胞成软骨的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(49): 9713-9714.