

人脐带源间充质干细胞分离培养方法的改进

李艳琪¹, 王洪一², 姚尧², 刘晶晶³, 徐潇², 张宇², 刘洋³, 吴祖泽^{1,4}, 靳继德⁴(¹天津大学化工学院制药工程系系统生物工程教育部重点实验室, 天津市 300072; ²解放军沈阳军区总医院, 辽宁省沈阳市 110016; ³北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京市 100022; ⁴军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京市 100039)

文章亮点:

在脐带干细胞的培养过程中, 实验特色性的对传统的组织块贴壁法进行了改进, 将传统组织贴壁法中本应丢弃的组织转移到新的培养瓶中, 进行二次贴壁培养, 在较短时间内获得更多数量的间充质干细胞。通过二次贴壁法得到的细胞经流式细胞仪检测符合间充质干细胞的特性, 且增殖能力旺盛, 具有体外多向分化潜能, 可成为临床研究和应用的细胞来源。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 脐带; 间充质干细胞; 分离培养; 二次贴壁

主题词:

干细胞; 脐带; 间充质干细胞; 细胞培养技术

摘要

背景: 脐带来源的间充质干细胞因其具有高度的自我更新和多向分化潜能, 以及取材方便等优点而日益受到关注。

目的: 建立一种改进的人脐带间充质干细胞分离、培养方法, 并对其生物学特性进行分析。

方法: 无菌条件下获取足月妊娠分娩胎儿脐带, 利用改良的组织块贴壁法分离培养脐带间充质干细胞, 即将传统组织贴壁法中本应丢弃的组织转移到新的培养瓶中进行二次贴壁培养, 取第3代脐带间充质干细胞进行生物学特性分析。

结果与结论: 组织贴壁后第5-7天可见有梭形细胞从组织块边缘爬出, 第10天左右可形成明显的细胞克隆。将组织块转移到新培养瓶中继续培养, 2d后即可见有细胞爬出, 细胞生长速度较快, 5d即可形成细胞克隆。传代后的细胞形态均一, 呈成纤维细胞样的长梭形。流式细胞仪检测细胞高表达CD90、CD105, 不表达CD34、CD45、HLA-DR。细胞增殖能力旺盛, 平均倍增时间为50h左右, 41.24%的细胞处于G₂/S期。体外可诱导分化为成骨细胞和脂肪细胞。上述实验结果证明二次贴壁培养出的细胞也具有间充质干细胞的生物学特性, 而且通过这种培养方法获得的原代间充质干细胞数是传统方式培养的2倍。

李艳琪, 王洪一, 姚尧, 刘晶晶, 徐潇, 张宇, 刘洋, 吴祖泽, 靳继德. 人脐带源间充质干细胞分离培养方法的改进[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(10):1609-1614.

An improved method for isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Li Yan-qi¹, Wang Hong-yi², Yao Yao², Liu Jing-jing³, Xu Xiao², Zhang Yu², Liu Yang³, Wu Chu-tse^{1,4}, Jin Ji-de⁴ (¹Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education and Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ²the General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; ³College of Life Sciences and Bio-engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; ⁴Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract

BACKGROUND: Human umbilical cord mesenchymal stem cells with capabilities for self-renewal and multi-differentiation have attracted widespread attention.

OBJECTIVE: To develop an efficient method for isolation and culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells, and to analyze the cell biological features.

METHODS: Mesenchymal stem cells were isolated and cultured from human umbilical cord by improved tissue cultivation. Immunophenotype and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Growth curve was determined by MTT assay, and differentiation ability was evaluated by *in vitro* osteogenic and adipogenic induction as well.

RESULTS AND CONCLUSION: Some fusiform cells crawled out from human umbilical cord tissues after cultivation for 5 days and formed colonies about 10 days later. When the removed tissues were further cultured, more cells appeared again within 2 days and formed colonies after 5 days. The isolated cells exhibited similar morphology of fibroblast-like shape after passage. Furthermore, the cells expressed CD90, CD105, but were negative for the markers of CD34, CD45, HLA-DR. Population doubling time of the cells calculated from the result of MTT was about 50 hours and cell cycle analysis showed that 41.24% cells were in the G₂/S phrase. Therefore, the isolated cells had a high proliferation ability. In addition, the isolated cells could be induced into osteoblasts

李艳琪, 女, 1988年生, 山东省淄博市人, 汉族, 天津大学在读硕士, 主要从事脐带间充质干细胞分离培养等方面的研究。

通讯作者: 靳继德, 博士, 副研究员, 军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京市 100039

并列通讯作者: 吴祖泽, 研究员, 中国科学院院士, 天津大学化工学院制药工程系系统生物工程教育部重点实验室, 天津市 300072; 军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京市 100039

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.10.021
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)10-01609-06
稿件接受: 2014-01-18

Li Yan-qi, Studying for master's degree, Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, and Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Corresponding author: Jin Ji-de, M.D., Associate investigator, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039, China

Corresponding author: Wu Chu-tse, Academician, Investigator, Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, and Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039, China

Accepted: 2014-01-18

and adipocytes *in vitro*. In a word, the results of this study demonstrated that the cells from the second tissues culture possessed the biological characteristics of mesenchymal stem cells and more primary umbilical cord mesenchymal stem cells were acquired through the improved method.

Subject headings: stem cells; umbilical cord; mesenchymal stem cells; cell culture techniques

Li YQ, Wang HY, Yao Y, Liu JJ, Xu X, Zhang Y, Liu Y, Wu CT, Jin JD. An improved method for isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(10):1609-1614.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是来源于发育早期中胚层的一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,可在体外分化成脂肪细胞、成骨细胞、心肌细胞、血管内皮细胞和表皮细胞等^[1-5]。早在20世纪70年代, Friedenstein等^[6]发现在骨髓中存在长梭形纤维细胞样的塑性贴附细胞,后来有学者利用梯度离心方法得到了占细胞总量0.001%~0.01%的高纯度的成纤维样贴壁细胞,这些细胞可以重复出以往Fridenstein等所进行的关于干细胞特性的所有实验,鉴于它们最终都可以分化为间质系统细胞,所以又将其定义为间质干细胞^[7-8]。体外培养的间充质干细胞形态均一,平行生长或漩涡状生长,能够表达多种表面抗原,如高表达间质细胞标志(CD44、CD90、CD105),不表达造血干细胞标志(CD34、CD45、CD14)、内皮细胞标志(CD31、CD33)及人白细胞抗原(HLA-DR、-DP、-DQ)等^[9]。

后来实验证明间充质干细胞分布广泛,存在于脂肪、脐带、皮肤、滑膜等多种组织中^[10-11],其中脐带来源的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因取材方便、无免疫排斥等优势而成为组织工程理想的种子来源。目前分离脐带来源的间充质干细胞主要有组织块贴壁法和酶消化法。酶消化法获得的细胞纯度略低、状态不均一、部分可能因消化酶的损伤无法贴壁生长;组织贴壁培养法得到的细胞纯度较高,对细胞伤害小,操作相对简单,将组织块剪碎、贴壁后加培养基培养即可,但原代培养所需周期较长、获得细胞数量相对有限。

本实验拟采用一种改良的二次组织贴壁培养方法,将传统组织贴壁法中本应丢弃的组织转移到新的培养瓶中,进行二次贴壁培养,以便在相对短的时间内获得更多数量的间充质干细胞,为临床研究和应用提供充足的细胞来源。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学观察实验。

时间及地点: 2012至2013年在军事医学科学院放射与辐射研究所实验室进行。

材料:

脐带标本: 取自解放军301医院的足月健康婴儿脐带组织,产妇及家属同意将脐带用于实验研究,产妇无传染性疾病,胎儿无先天性疾病。

人脐带来源间充质干细胞分离培养实验所需主要试剂:

试剂	来源
培养基DMEM/F12、DMEM-HG	GIBCO
胰蛋白酶	Amresco
胎牛血清	Hyclone
荧光标记小鼠抗人单抗CD34-FITC、CD45-PE、BD Biosciences CD90-PE、CD105-PE、HLA-DR-PE、小鼠同型阴性对照IgG-FITC、IgG-PE	
PI染液	赛尔斯生物技术有限公司
RNA酶、地塞米松、胰岛素、IBMX、吡啶美辛、 甘油磷酸钠、抗坏血酸	Sigma

实验方法:

脐带间充质干细胞的分离、培养: 将无菌条件下取得的足月妊娠分娩胎儿脐带,用PBS洗3次,去掉残留的血细胞。把脐带剪切成2.0 cm左右的片段并剔除血管(1条脐静脉, 2条脐动脉),取出其中的凝胶状组织,将其剪成大小约1 mm³的组织块,然后置于培养瓶中。6 h后,加入含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM/F12培养基,放置在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。3 d后半量换液,1周后再次换液,此后每隔3 d换液1次。观察贴壁组织周围的细胞生长情况,当细胞达到80%~90%融合度时,用胰酶消化传代,并将组织转移到一个新的培养瓶中,按上述方法继续培养,获得第二次组织块贴壁培养的细胞。取第二次组织培养得到的脐带间充质干细胞进行下述实验。

细胞免疫表型鉴定: 取第3代脐带间充质干细胞,0.05%胰酶消化后制备成单细胞悬液。用预冷的PBS洗2次后重悬于0.5 mL PBS,分别加入FITC-CD34, PE-CD45, PE-CD90, PE-CD105, PE-HLA-DR抗体或小鼠IgG对照,4 °C避光孵育30 min, PBS洗涤2次,于流式细胞仪检测分析。

MTT法测定细胞生长曲线: 取第3代脐带间充质干细胞,以1×10⁷ L⁻¹的细胞浓度接种于96孔板,每孔200 μL,各设6个复孔,于37 °C、体积分数为5% CO₂的培养箱中培养。每天在固定时间点取出96孔板,每孔加入20 μL MTT (5 g/L),37 °C培养箱中放置4 h;轻轻吸掉培养基上清,然后每孔加入二甲基亚砜150 μL,用酶标仪(波长490 nm)测定各孔吸光度值,以时间为横轴、吸光度值为纵轴绘制生长曲线。按公式计算倍增时间(Population doubling time, PDT):

$$PDt = t[\lg 2 / (\lg A_t - \lg A_1)]$$

其中, t 为培养的天数, A_t 为培养 t 天的吸光度值, A_1 为接种后第1天的吸光度值。

流式细胞仪测细胞周期: 取第3代处于生长对数期的脐带间充质干细胞, 0.05%胰酶消化后制备成单细胞悬液, 离心收集细胞, 用预冷的PBS洗涤3次后加入预冷的体积分数为70%乙醇, 吹打成单细胞悬液, 4 °C固定过夜; 离心去固定液, PBS洗涤1次, 离心去上清, 加入500 μ L碘化丙啶(RNase A质量浓度100 mg/L, 碘化丙啶质量浓度50 mg/L), 4 °C避光孵育30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

成脂、成骨诱导分化: 对于成脂诱导分化, 将第3代脐带间充质干细胞以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于24孔板内。当细胞达到70%融合时, 去掉原培养基, 加入含体积分数为10%胎牛血清、1 μ mol/L地塞米松、10 mg/L胰岛素、200 mmol/L吡哆美辛的DMEM(HG)成脂诱导培养液, 每隔3 d换1次液, 诱导2周。当观察到胞质中脂滴形成时, 小心移去培养液, 用PBS轻洗2次, 40 g/L多聚甲醛固定20 min, 油红O染色30 min, 于倒置显微镜下观察、拍照。

对于成骨诱导分化, 取第3代脐带间充质干细胞, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于24孔板内。于第2天去掉原培养基, 加入含有体积分数为10%胎牛血清、0.1 μ mol/L地塞米松、10 mmol/L甘油磷酸钠、50 μ mol/L抗坏血酸的DMEM/F12成骨诱导培养液进行诱导培养, 每隔3 d换1次液, 诱导3周, 当观察到有圆形钙化结节形成时用茜素红染色鉴定。

主要观察指标: 倒置显微镜观察细胞形态, 流式细胞仪检测细胞表面标志物及细胞周期, MTT法检测细胞增殖能力, 茜素红染色鉴定细胞成骨分化能力, 油红O染色鉴定细胞成脂分化能力。

2 结果 Results

2.1 脐带间充质干细胞的分离、培养 组织块培养第5天左右, 开始有细胞从组织块边缘爬出, 呈细小梭形(图1A); 第10天左右可形成明显的细胞克隆。将组织块转移到新培养瓶中后, 2 d即可见有细胞爬出, 5 d可形成细胞克隆(图1B)。用这种方法可在短时间内获得原来两倍的细胞量。传代后的细胞生长速度较快, 形态均一, 呈梭形或成纤维状。

2.2 细胞免疫表型鉴定 流式细胞分析结果显示(图2), 分离培养的第3代细胞表达 CD90(99.35%)、CD105(99.13%), 不表达CD34(0%)、CD45(0.47%)、HLA-DR(0.13%), 说明第2次组织贴壁培养得到的细胞也是间充质干细胞。

2.3 脐带间充质干细胞的生长曲线 由生长曲线(图3)可知, 细胞传代后前两天增殖不明显, 3-5 d进入对数生长期, 第6天开始进入平台期, 根据生长曲线计算细胞培养第5天的倍增时间为50 h。

2.4 细胞周期 细胞周期检测结果(图4)显示, 第3代脐带源间充质干细胞58.76 %处于G₀/G₁期, 16.70%处于G₂/M

期, 24.54 %处于S期, 说明第3代细胞增殖能力旺盛。

2.5 诱导分化 成脂诱导后, 细胞形态逐渐由典型的长梭形变短、变圆, 呈椭圆形。诱导10 d后于镜下可见胞浆内出现点状小脂滴, 继续诱导培养1周, 胞浆内脂滴增多增大。油红O可见胞浆内的大量脂滴染成红色(图5A), 说明脐带源间充质干细胞在体外具有向脂肪细胞分化的潜能。

成骨诱导1周左右, 细胞逐渐由长梭形变为方形、鳞片形。诱导2周后, 细胞外基质分泌增多, 胞质中及胞质外出现许多黑色小颗粒, 3周后可见结节状结构。茜素红染色可见红色矿化沉着物(图5B), 说明脐带源间充质干细胞在体外具有向成骨细胞分化的潜能。

3 讨论 Discussion

间充质干细胞是目前备受关注的一类具有多向分化潜能的组织干细胞, 在细胞治疗领域有着重要的应用前景。临床上应用间充质干细胞已经在神经系统疾病、心血管系统疾病、糖尿病及肝脏疾病等方面取得了重要进展, 如治疗脊髓损伤、脑缺血、心脏病、多发性硬化、成骨不全症等^[12-15]。体外培养的骨髓间充质干细胞已被广泛应用于研究领域^[16-19], 然而骨髓间充质干细胞的增殖分化潜能会随供者年龄的增大而下降, 并且采集骨髓常常存在出血和感染等问题^[20-21], 这些都限制了骨髓源间充质干细胞的临床应用和研究。脐带是连接胎儿脐部与胎盘之间的组织, 一般在胎儿分娩时被当作废弃物。脐带取材方便, 易于收集保存, 不易污染, 不涉及伦理道德问题, 而且脐带组织中的间充质干细胞含量丰富, 较为原始, 分化能力强, 可在体外迅速扩增、生物性能稳定, 为细胞治疗提供了一种新的种子细胞来源。

本实验在传统组织块贴壁法的基础上进行二次贴壁培养, 得到脐带源间充质干细胞。脐带包括1条静脉和2条动脉, 周围是华通氏胶组织, 外层由羊膜来源的上皮包裹。传统组织贴壁法是将脐带中的华通氏胶剪碎贴壁^[22-23], 1周左右可以在光镜下观察到少数长梭形贴壁生长的细胞或从小组织块周围长出少许贴壁生长的细胞, 大约2周时可见大量长梭形细胞散开分布或围绕组织块呈克隆状生长, 用胰酶消化传代时即将组织块丢弃。本实验首次组织块贴壁培养情况和上述结果相符, 但是并未将培养后的组织块丢弃, 而是转移到新的培养瓶中继续培养, 两三天即可见到贴壁细胞, 第5天可形成明显的细胞克隆。相对于传统组织贴壁法, 这种改进的方法可在较短时间内获得大量原代细胞。

脐带源间充质干细胞不表达或低表达免疫排斥相关标记, 是一类免疫缺陷细胞, 异体移植无免疫排斥反应或反应较弱, 适宜于不同个体之间的移植, 是细胞治疗的理想靶细胞。经流式检测结果显示, 二次贴壁培养所获得的细胞高表达CD90、CD105, 不表达造血干细胞标记CD34、CD45, 不表达HLA-DR, 具有低免疫原性, 符合间充质干细胞的特性。

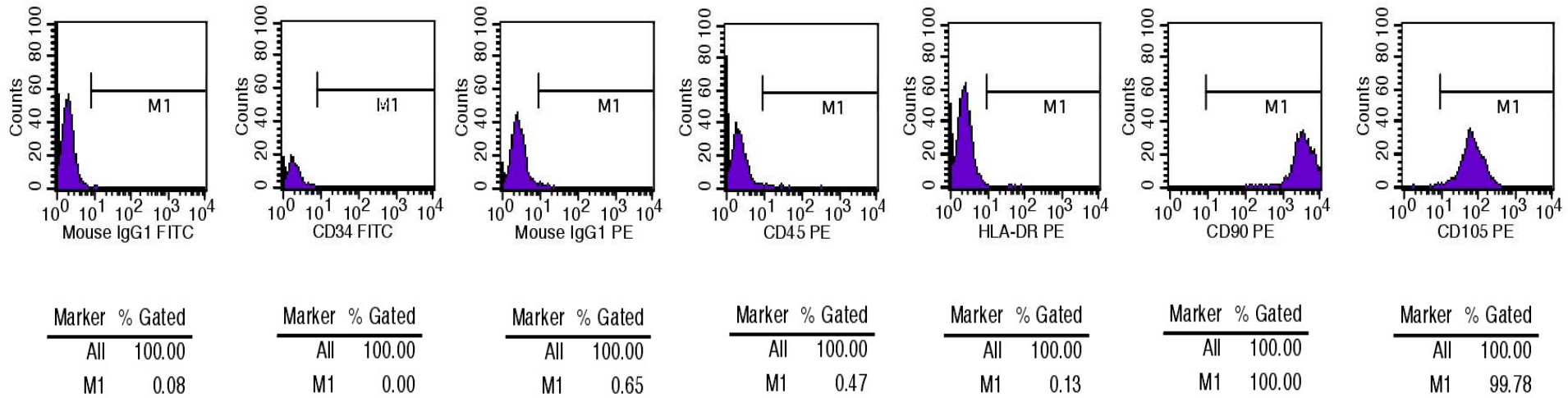


图2 人脐带间充质干细胞表面标志物表达

Figure 2 Expression of surface markers from human umbilical cord mesenchymal stem cells

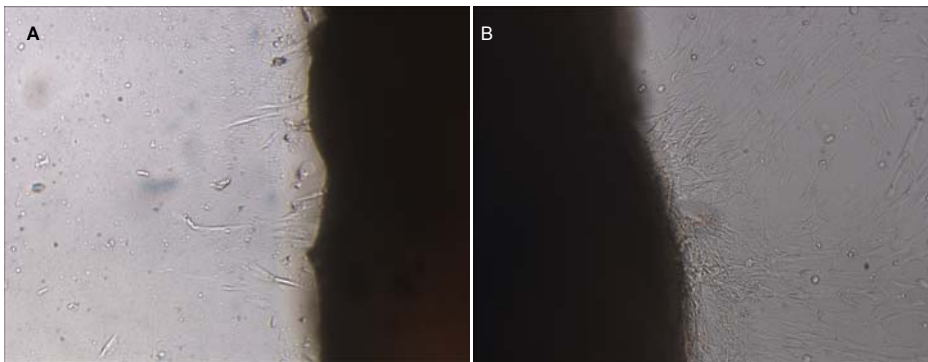


图1 原代培养人脐带间充质干细胞($\times 400$)

Figure 1 The primary culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells ($\times 400$)

图注: 图中 A 为首次组织块贴壁培养第 5 天, 镜下可见有少量细胞从组织块边缘爬出, 呈细小梭形(黑色部分为贴壁组织块); B 为第 2 次组织块贴壁培养第 5 天, 镜下可见组织块周围的细胞呈放射状生长(黑色部分为贴壁组织块)。

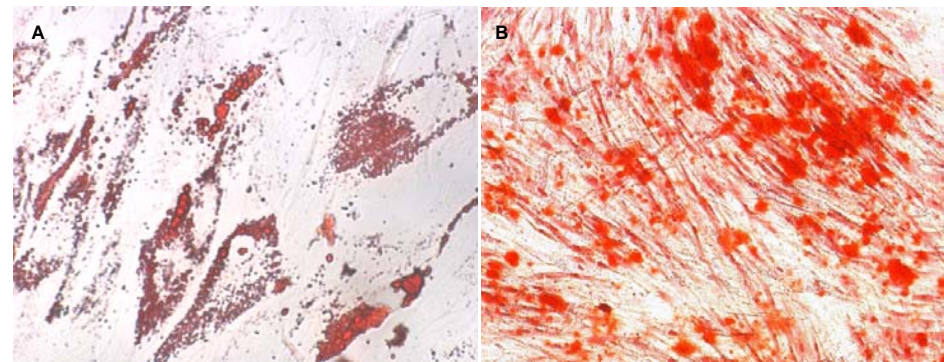


图5 脐带间充质干细胞成脂和成骨诱导分化结果($\times 400$)

Figure 5 Osteogenic and adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells ($\times 400$)

图注: 图中 A 为镜下可见油红 O 染色后细胞呈现椭圆形, 细胞内有大量密集红色脂滴; B 为镜下可见细胞经茜素红染色后有大量红色矿化沉着物。

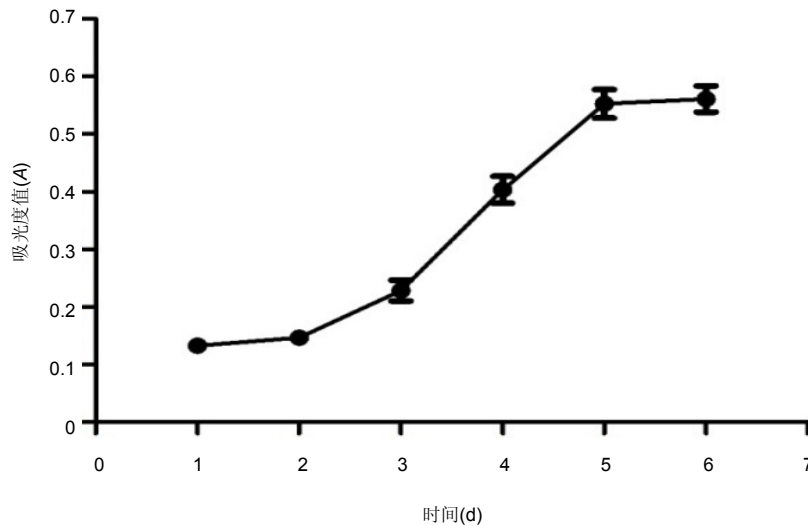


图3 人脐带间充质干细胞的生长曲线

Figure 3 Growth curve of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 传代后前两天细胞增殖不明显, 3-5 d 进入对数生长期, 第 6 天开始进入平台期。

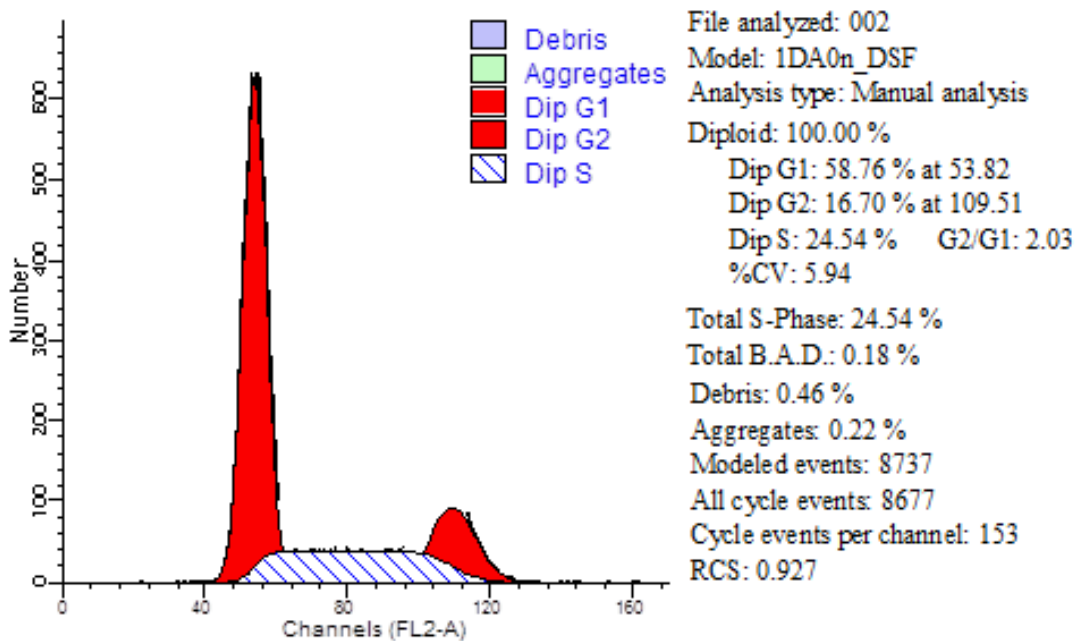


图4 人脐带间充质干细胞的细胞周期分析结果

Figure 4 Cell cycle analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 第 3 代人脐带间充质干细胞 58.76 % 处于 G_0/G_1 期, 16.70 % 处于 G_2/M 期, 24.54 % 处于 S 期, 说明第 3 代细胞增殖能力旺盛。

间充质干细胞的培养潜伏期为 12-24 h, 2 d 后进入对数生长期, 对数增殖期持续 3-5 d, 六七天后进生长平台期。实验通过 MTT 法得到细胞的生长曲线, 由生长曲线可知细胞的群体倍增时间为 50 h, 与之前文献报道的 45 h 差异不大^[24]。细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 其中 S 期为 DNA 合成期, 实验结果显示 41.24% 的脐带源间充质干细胞处于 G_2/S 期, 比以往文献报道的 G_2/S 期比例高^[23-24], 表明细胞有丝分裂旺盛, 增殖能力强。大量研究表明间充质干细胞具有可塑性, 经体外诱导培养能向多种成体细胞分化^[25]。本实验获得的脐带源间充质干细胞也可

在体外诱导为成骨细胞和脂肪细胞, 符合间充质干细胞多向分化潜能特性。因此, 上述实验结果表明, 二次贴壁培养获得的细胞也具有间充质干细胞的生物学特性。

实验对传统组织块贴壁法分离培养脐带源间充质干细胞进行了改进, 将培养后的组织块转移到新的培养瓶后, 细胞的生长速度加快, 可在短时间内扩增出大量原代细胞。间充质干细胞作为种子细胞在细胞替代治疗方面显示出巨大的前景, 实验所用的这种改进的脐带源间充质干细胞原代分离培养方法, 简单快捷, 相同的原料, 可获得更多的原代间充质干细胞, 为其临床研究和应用提供了实验依据。

作者贡献: 实验设计为第七作者, 实验实施为第一、二、三、七作者, 实验评估为第四、五、六作者, 资料收集为第一作者。第一作者成文, 通讯作者进行审校, 第一作者和通讯作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求: 提供样本的产妇及家属同意将脐带用于实验研究, 并且签署“知情同意书”, 实验方案获得医院伦理委员会批准。

学术术语: 细胞周期-由细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程, 可分为 G₁、S、G₂ 和 M 期 4 个时期。G₁ 期为 DNA 合成前期, 主要合成 RNA 和核糖体; S 期为 DNA 合成期; G₂ 期为 DNA 合成后期, DNA 合成终止; M 期为有丝分裂期。细胞周期可反映细胞的增殖能力。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, et al. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):639-647.
- [2] 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.
- [3] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1417-1426.
- [4] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
- [5] 唐欣, 王岩, 易海波, 等. 人脐带间充质干细胞诱导分化为心肌细胞的特异性基因表达[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(27): 4988-4991.
- [6] Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2):230-247.
- [7] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-395.
- [8] Prockop DJ. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(3):241-243.
- [9] 马锡慧, 冯凯, 石炳毅. 人脐带间充质干细胞生物学特性及其研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2011, 15(32):6064-6067.
- [10] Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5): 509-525.
- [11] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-2213.
- [12] Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003;102(10):3483-3493.
- [13] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
- [14] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-884.
- [15] Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(8):881-887.
- [16] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392.
- [17] Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):713-734.
- [18] Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5:19.
- [19] 余丽菲, 夏宁, 梁瑜祯. 干细胞移植治疗下肢缺血性疾病[J]. *医学综述*, 2006, 12(9):544-546.
- [20] Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, et al. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*. 2007;25(11):2837-2844.
- [21] Rice CM, Scolding NJ. Autologous bone marrow stem cells—properties and advantages. *J Neurol Sci*. 2008; 265 (1-2):59-62.
- [22] 庞荣清, 何洁, 李福兵, 等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2011, 1(2):30-33.
- [23] 王娟, 陆琰, 何冬梅, 等. 人脐带间充质干细胞体外分离、纯化及鉴定[J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2009, 30(4):367-372.
- [24] 徐燕, 李长虹, 孟恒星, 等. 人脐带间充质干细胞分离培养条件的优化及其生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(32): 6289-6294.
- [25] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.