

脐带间充质干细胞培养中的染色标记及示踪技术

黄霞^{1,2}, 潘兴华¹, 庞荣清¹, 阮光萍¹, 蔡学敏¹(¹解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心, 云南省干细胞工程实验室, 云南省昆明市 650032; ²昆明医科大学临床学院, 云南省昆明市 650031)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 脐带间充质干细胞培养技术及方法已应用于组织工程种子细胞的培养, 此细胞免疫原性低, 可有望缓解器官移植带来的免疫排斥反应所带来的问题。
- 2 文章增加的新信息: 脐带间充质干细胞虽培养成功, 但尚未得到广泛应用, 最关键的原因是脐带间充质干细胞的分离培养技术不是很成熟。另一方面, 在脐带间充质干细胞体外培养中有很多人因素, 如选择的培养基、酶的敏感性、pH值、脐带的新鲜程度等都会影响脐带间充质干细胞的生长。这些方面都值得在研究中进一步优化。脐带间充质干细胞的体外标记能检测到脐带间充质干细胞的增殖、分裂、分化等情况, 为脐带间充质干细胞移植治疗人类疾病提供了广阔的临床应用前景, 将对细胞治疗和基因治疗起到极大的推动作用。
- 3 提供临床借鉴的价值: 近年来, 利用脐带间充质干细胞的各种生物学特性、及细胞标记的示踪技术, 已开展了各项人类疾病的基础研究和临床前研究, 比如: 人体各器官损伤经细胞移植治疗研究; 代谢性疾病、免疫性疾病、心血管疾病等细胞移植治疗研究、均有无可比拟的疗效且优于传统的治疗方法, 故完善脐带间充质干细胞的培养技术为将来的临床治疗提供更好的方案奠定了基础。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 间充质干细胞; 脐带间充质干细胞; 细胞培养; 染色标记; 国家自然科学基金

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 脐带; 细胞, 培养的; 干细胞移植

基金资助:

国家自然科学基金(31172170)

摘要

背景: 脐带间充质干细胞的培养是进行脐带间充质干细胞研究时极其重要的部分, 细胞培养技术的优化对推动间充质干细胞的临床应用特别是细胞治疗至关重要。同时, 脐带间充质干细胞标记及示踪技术是干细胞移植治疗的研究热点之一。

目的: 对国内外脐带间充质干细胞染色标记技术的研究与进展作一综述。

方法: 以“干细胞, 间充质干细胞, 脐带间充质干细胞, 细胞培养, 染色标记”为中文检索词, 以“Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, Cell culture, Labeling methods”为英文检索词, 检索维普和中国知网(CNKI)期刊全文数据库、Medline, highwire 和外文生物医学期刊全文数据库(Foreign Journals Integration System)2001年1月至2013年10月有关脐带间充质干细胞的培养及标记染色文献。最终纳入35篇文献进行综述。

结果与结论: 脐带间充质干细胞尚未得到广泛应用, 最关键的原因是脐带间充质干细胞的分离培养及染色技术不是很成熟, 这些方面都值得在研究中进一步优化。虽然近几年脐带间充质干细胞标记及示踪技术有了较快的进展, 但仍存在许多问题有待进一步解决。

黄霞, 潘兴华, 庞荣清, 阮光萍, 蔡学敏. 脐带间充质干细胞培养中的染色标记及示踪技术[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3751-3755.

Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell culture: dyeing and tracer technique

Huang Xia^{1,2}, Pan Xing-hua¹, Pang Rong-qing¹, Ruan Guang-ping¹, Cai Xue-min¹ (¹Research Center for Stem Cells and Organ Tissue Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Clinical School, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The culture of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells is extremely important for studies on umbilical cord mesenchymal stem cells. Optimization of cell culture technology is crucial for clinical application of mesenchymal stem cells and even cell therapy. Meanwhile, the labeling and tracer technique of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells is a hotspot in stem cell transplantation.

OBJECTIVE: To review the research and development of the cell markers and tracer methods of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells.

METHODS: A computer-based search of VIP, CNKI, Medline, Highwire and Foreign Journals Integration System databases was performed for articles concerning culture and labeling of umbilical cord-derived mesenchymal stem

黄霞, 女, 1980年生, 广东省深圳市人, 汉族, 2008年中南大学毕业, 主要从事脐带间充质干细胞研究。

通讯作者: 潘兴华, 博士, 博士后, 主任医师, 解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心, 云南省干细胞工程实验室, 云南省昆明市 650032

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.23.024

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)23-03751-05

稿件接受: 2014-04-19

Huang Xia, Research Center for Stem Cells and Organ Tissue Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China; Clinical School, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Corresponding author: Pan Xing-hua, M.D., Chief physician, Research Center for Stem Cells and Organ Tissue Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Accepted: 2014-04-19

cells published from January 2001 to October 2013. The keywords were "stem cells, mesenchymal stem cells, umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, cell culture, labeling methods" in Chinese and English, respectively. Finally, 35 articles were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells have not yet been widely used, mainly because of the immature isolation, culture and staining techniques of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. These techniques are worthy of further optimization studies. Although in recent years, cell markers and tracer technology of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells have made great progress, there are still many problems need to be solved.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; umbilical cord; cells, cultured; stem cell transplantation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31172170

Huang X, Pan XH, Pang RQ, Ruan GP, Cai XM. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell culture: dyeing and tracer technique. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(23):3751-3755.

0 引言 Introduction

干细胞即起源细胞,是一类具有多向分化潜能和自我复制能力的原始的未分化细胞,是形成哺乳类各组织器官的原始细胞^[1]。早期胚胎和成年机体,均可发现干细胞。而从早期胚胎中取出的干细胞,才是胚胎干细胞^[2],具备体内外发育分化的全能性;其他从成体组织如肌肉、骨髓等获得的干细胞,称之为成体干细胞^[3],只具有部分发育分化功能,只能分化为一种或多种功能细胞。

间充质干细胞是来源于中胚层的一种成体干细胞,其广泛存在于骨髓、脂肪、肌肉等组织中,具有自我更新能力和多向分化潜能^[4]。在这些组织中,间充质干细胞的含量很低,但在体外容易分离获得,可以继续培养扩增,外源基因易于导入并表达^[5]。如果在恰当的诱导条件下,间充质干细胞能够向软骨、骨、脂肪、肌肉、神经等多种组织细胞进行分化。由于间充质干细胞具有以上特性,所以其在基因治疗和干细胞移植等方面具有十分广阔的应用前景和实用价值。

脐带间充质干细胞是位于脐带沃顿胶(Wharton jelly)和血管周围组织中的一种成体干细胞^[6-10]。研究表明,脐带间充质干细胞的绝大多数生物学特征与骨髓间充质干细胞相似,但在CFU-F频率、增殖能力、CD106、HLA-I表达和神经诱导分化能力等方面甚至要优于骨髓间充质干细胞^[11]。因此,脐带间充质干细胞有望成为骨髓间充质干细胞的理想替代来源,其应用具有更广阔的前景,但脐带间充质干细胞的研究目前仍存在很多有待解决的问题。本文就脐带间充质干细胞培养、培养条件优化及体外染色标记等方面作一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

检索人相关内容: 第一作者。

检索时间: 2001年1月至2013年10月。

检索词: 中文检索词为“干细胞,间充质干细胞,脐带间充质干细胞,细胞培养,染色标记”;英文检索词为“Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, Cell culture, Labeling methods”。

检索数据库: 维普, CNKI, Medline, highwire, Foreign Journals Integration System等数据库。

检索文献量: 检索文献数量总计203篇。

1.2 检索方法

纳入标准: ①具有原创性,论点论据可靠的文章。②针对性强,相关度高的文献。③对同一领域的文献选择近期发表或权威杂志的文献。

排除标准: 较陈旧的理论观点以及一些重复性研究。

2 结果 Results

2.1 纳入文献基本情况 初检得到203篇文献,其中英文文献193篇,中文文献10篇。阅读标题和摘要进行初筛,排除与研究目的不符和重复性文章;查阅全文,判断与纳入标准一致的文章,最后选择35篇符合标准的文献。文献[1-11]研究了脐带间充质干细胞基本理论知识,文献[12-23]研究了脐带间充质干细胞的培养及培养条件的优化,文献[24-35]篇研究了脐带间充质干细胞的体外荧光染料标记。

2.2 结果描述

2.2.1 脐带间充质干细胞的培养 脐带标本应选择健康足月产出的新生儿脐带。分离培养脐带间充质干细胞主要有酶消化法^[12]、组织平铺法等^[13]。①酶消化法:将脐带组织剪碎,用IV型胶原酶消化后离心,取下层沉淀,用胰蛋白酶消化后再次离心,取沉淀,以PBS吹打悬浮,100 μm滤网过滤,滤过液以2 000 r/min离心10 min,取沉淀,以PBS洗涤细胞2遍,每遍800 r/min离心10 min,以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度悬浮于DMEM培养基中,置于培养箱培养。②组织平铺法^[14]:分离培养细胞。将组织块剪成1 mm×1 mm×1 mm大小,平铺于培养瓶底,组织块接种至DMEM/F12培养基中,放置于二氧化碳培养箱内培养,1周之后更换培养基。细胞生长至80%融合时,用0.25%胰酶将其消化,进行传代培养^[14]。培养基是关系细胞培养成功与否的一个十分重要因素^[15],目前用于培养脐带间充质干细胞的培养基大多为L-DMEM培养基加上体积分数10%胎牛血清^[15]。

2.2.2 脐带间充质干细胞的培养条件优化 在从脐带

上分离间充质干细胞过程中, 酶处理在分离脐带间充质干细胞中起十分重要作用^[16]。目前使用的主要有组织块贴壁法和酶消化法或两者的结合。使用组织块贴壁法分离时^[17-18], 7-10 d后可见贴壁生长的单个长条梭形细胞从组织块中分离出来, 细胞融合可以达80%-90%时, 用0.25%的胰蛋白酶进行消化传代^[17-18]。酶消化法, 就是对剪碎后的脐带组织块加入胰蛋白酶、胶原酶或各种酶的混合液对其进行消化, 直接得到贴壁生长的单个细胞。在消化过程中加入DNA酶可有助于分散细胞^[19]。虽然酶消化法能较快分离出间充质干细胞, 但是酶体系中可能会降解细胞膜外层蛋白, 甚至可能导致细胞较难贴壁。因此, 把握好酶的用法、用量及消化的时间是分离脐带间充质干细胞的关键。

目前, 已有多个研究小组已成功从脐带组织中分离出具有间充质干细胞特性的干细胞。据研究组和培养方法的差异, 将所得到的贴壁细胞分成为间充质干细胞、类间充质干细胞或基质干细胞^[20]。研究发现脐带血管周围的脐带沃顿胶组织中含有大量的间充质干细胞, 通过植块法或酶消化法进行培养可以得到更高增殖活性的具有间充质干细胞性质的干细胞^[21]。Kern等^[21]认为, 原因可能是培养体系的差别影响了细胞的增殖能力, 但本体系中细胞平均4 d即可传1代, 细胞平均倍增6.18倍, 因此短期培养也可获得足够的细胞数进行细胞临床等方面的应用。利用流式细胞仪检测发现, 将细胞传至3代之后, 获得的间充质干细胞纯度与原有的纯度有所提高, 即细胞表达间充质干细胞的特性^[18, 21-22]。

齐凯等^[23]比较了以II型胶原酶为主要成分的混合酶I、以胰酶为主要成分的混合酶II和以II型胶原酶-胰酶-DNA酶为主要成分的混合酶III对脐带间充质干细胞分离效果的影响, 结果显示以II型胶原酶-胰酶-DNA酶为主要成分的混合酶III可以增高从脐静脉酶解得到的总细胞数、培养3代后得到的脐带间充质干细胞细胞数, 虽然在酶降解3 h后得到的细胞中死细胞比较多, 但是经体外培养传代后对其增殖能力没有影响。齐凯等^[23]认为混合酶III对分离脐带间充质干细胞有利。

2.2.3 脐带间充质干细胞的体外荧光染料标记 荧光染料标记在医学、生命科学等方面具有相当大的应用前景和潜在价值。随着医学生命科学的向前发展, 以及计算机技术、激光技术、荧光光谱测定技术的不断进步, 很多染料特别是荧光染料在DNA测序、毒物分析、细胞检测、临床诊断等多方面得到了很好的应用。荧光染料标记的原理是将一些能够结合到胞内或胞膜不同组织上的荧光染料, 从而达到对细胞进行观察的目的。在脐带间充质干细胞中常用的荧光染料主要有DAPI、Di-I、PKH26/PKH67、CFSE、绿色荧光蛋白等^[24-27]。

DAPI: DAPI即4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(4', 6-diamidino-2-phenylindole)^[24, 28], 相对分子质量350。

它具有专一性强、灵敏度高、稳定性好等特点。是一种能够与DNA强力结合的荧光染料, 常利用荧光显微镜进行检测。由于DAPI能够透过完整的胞膜, 它能用于活细胞和固定细胞的染色标记。在紫外光的激发下发出浅蓝色荧光。但是随着细胞的不断分裂增殖, DAPI被均匀分配到子代细胞中, 以至于DAPI标记强度降低, 灵敏度随之下降。DAPI除与DNA双链相结合之外, 还可以和胞浆之中的微管蛋白相结合, 所以细胞浆也能标记成蓝色。DAPI标记细胞的缺点就是如果标记的细胞死亡后, 就能释放出来DAPI, 把周围没有标记的细胞标记, 导致假阳性, 上述问题是人们使用此类荧光染料标记细胞时该考虑的问题。Castanheira等^[28]评估DAPI作为核示踪剂标记间充质干细胞, 观察将其注射至视网膜损伤的大鼠视网膜玻璃体腔内的迁移和分布。Castanheira等认为DAPI标记干细胞在体内实验中不是一个理想的标记物。由于随着细胞的分裂增殖, DAPI被平分至子代细胞中, 引起DAPI标记强度下降, 灵敏度减低。因此, DAPI也只适用于短期的标记示踪。

Di-I: Di-I (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocyanine perchlorate) 即1, 1'-双十八烷-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶碳花青-高氯酸盐, 是一种亲脂性长链碳花青染料, 易嵌入生物膜内并在膜内作侧向扩散运动, 从而标记整个细胞^[25, 29]。还可以通过活细胞的胞饮作用进入胞质, 标记整个细胞质。在水中具有弱荧光, 当掺入膜中时荧光增强, 而且光稳定性十分好, 荧光保持时间长, 在标记细胞内消失慢, 不容易在标记与非标记细胞之间传递, 无细胞毒性, 在细胞膜中的存在不影响细胞活力、发育或其他生理学性质。Hu等^[29]用CM-DiI标记间充质干细胞, 观察到CM-DiI标记可维持到移植后8周。DiI标记技术简单, 染色快, 标记效率也很高。但因为Di-I标记的是细胞膜, 因此存在着随着细胞分裂荧光强度减低的缺点, 不适于长期细胞的追踪。

PKH26/PKH67: PKH26/PKH67 PKH^[26, 30]荧光细胞标记试剂细胞膜标记技术, 在细胞膜的脂质双分子层中稳定结合红色荧光染料-PKH26/绿色荧光染料-PKH67, 产生稳定、清晰、精确和可重复的荧光标记细胞, 可广泛用于动物、植物细胞和其它含颗粒胞膜的标记。在适当的标记条件下, PKH26不影响细胞的增殖和分化能力; 当细胞分裂时, PKH26可以平分至两个子代细胞中, 荧光强度是上一代细胞的一半, 胞膜能发出红色荧光, 不会影响胞膜表面标记物的表达, 在恰当的条件下不影响细胞的活力。Shao-Fang等^[26]探讨PKH26标记脐带间充质干细胞是否影响细胞的形态、表型、核扩散和分泌能力。分离出来的脐带间充质干细胞用PKH26标记, 利用显微镜观察细胞的形态。没有检测到PKH26标记与未标记的细胞存在细胞形态学、细胞生长和增殖效率的差异。Shao-Fang等认为PKH26标记的荧

光强度随着时间的推移逐渐降低。总之, PKH26标记人类脐带间充质干细胞是一种安全、有效的标记方式。因此, PKH经常被应用于体内、体外短期的细胞示踪研究实验。

羧基荧光素乙酰乙酸(CFSE): CFSE是一种能够穿过胞膜的荧光染料, 进入细胞后不可逆地与胞内具有非酶促水解作用的羧基荧光素二醋酸盐基团结合, 偶联到细胞蛋白质上, 且不会引起细胞发生凋亡或死亡^[27, 31-32]。CFSE一旦进入细胞后就不能从细胞中释放出来, 并且自发地不可逆地与胞内蛋白质和细胞膜表面蛋白结合。当细胞进行有丝分裂和细胞增殖时, 具有荧光的胞质蛋白被平分到第二代细胞中, 这样与第一代细胞相比, 这样荧光强度也将会减弱至原来的一半; 按这样计算, 有丝分裂至第三代细胞的荧光强度将会比第二代细胞更加减弱。此现象可以在488 nm的激发光下, 使用流式细胞仪进行检测分析, 通过检测到细胞荧光强度不断的下降, 详细分析得出细胞分裂和增殖的情况。所以, CFSE经常被用来做活细胞检测实验和用荧光电镜观察细胞长期活动的实验。Chadli等^[31]研究了使用胞内荧光染料CFSE检测正常人类角质细胞的细胞分裂。结果表明, CFSE标记的细胞能跟踪监测的角化细胞响应性增长, 在这里充分体现了转化生长因子 $\beta 1$ 介导的细胞循环抑制。因此, CFSE常被用来做活细胞检测试验和用荧光电镜观察细胞长期活动的试验。

绿色荧光蛋白: 绿色荧光蛋白是一类存在于腔肠动物体内的生物发光蛋白, 由于水母整体所发出的荧光及提取的蛋白质颗粒所发出的荧光都呈绿色, 因此, 把这种蛋白质命名为绿色荧光蛋白^[33]。绿色荧光蛋白是能在异源细胞内表达后, 能自发产生荧光的蛋白, 且绿色荧光蛋白的相对分子质量比较小, N-端和C-端都能接受蛋白质的融合, 是很好的标记物, 可以进行活细胞实时定位观察, 更加能靠近自然真实的状态。如果在活细胞中直接观察蛋白质向细胞核、内质网运动的状态, 并且可以实时观察到外界信号刺激下, 目的蛋白质的变化过程, 使用荧光显微镜观察, 使研究更加方便。借助激光共聚焦显微镜, 其图像效果更好, 利用现代的计算机软件, 可以进行三维图像的显示^[33]。刘毅等^[34]构建共表达增强型绿色荧光蛋白基因和人胰岛素(insulin)基因的慢病毒载体, 探讨其对脐带间充质干细胞的转染情况。结果发现成功构建了共表达insulin基因和增强型绿色荧光蛋白基因的重组慢病毒载体 pLenti6.3-insulin-IRES-EGFP, 并对其成功包装、纯化及浓缩, 病毒滴度为 1.3×10^8 TU/mL。不同MOI的重组慢病毒感染人脐带间充质干细胞之后, 通过绿色荧光蛋白表达的阳性细胞数筛选其最适MOI为10, 此时对细胞的转染率可以达到90%^[34]。刘毅等^[34]认为构建的携带insulin基因的重组慢病毒载体 pLenti6.3-insulin-IRES-EGFP可有效转染人脐带间充质干细胞, 表达insulin蛋白。唐莉等^[35]将携

带绿色荧光蛋白的慢病毒感染hU-CMSCs, 并且观察其对Oct4表达的影响。结果发现体外培养出的人脐带间充质干细胞呈长梭形形成纤维细胞样, 荧光显微镜观察在感染96 h后荧光表达最强; 当以MOI=20感染细胞96 h后, 绿色荧光蛋白阳性率达75%以上; 与未感染组相比, MTT显示绿色荧光蛋白慢病毒对细胞增殖没有明显影响($P > 0.05$)。免疫荧光染色检查显示Oct4在培养的第2周、第8周中都有表达且定位于细胞核。唐莉等^[35]认为慢病毒携带的绿色荧光蛋白基因能够表达于人脐带间充质干细胞中, 并且不影响Oct4基因的表达。

3 展望 Prospects

目前, 脐带间充质干细胞尚未得到广泛应用, 最关键的原因是脐带间充质干细胞的分离培养技术不是很成熟。另一方面, 在脐带间充质干细胞体外培养中有很多人因素, 如选择的培养基、酶的敏感性、pH值、脐带的新鲜程度等都会影响脐带间充质干细胞的生长。这些方面都值得在研究中进一步优化。脐带间充质干细胞的体外标记能检测到脐带间充质干细胞的增殖、分裂、分化等情况, 当然体外标记的方法还有抗原标记法、同位素标记法、荧光蛋白标记法、核磁共振标记等。总之, 脐带间充质干细胞移植为治疗人类疾病提供了广阔的前景, 脐带来源的干细胞有望成为组织工程中的种子细胞, 将对细胞治疗和基因治疗起到极大的推动作用。

致谢: 衷心感谢导师潘兴华教授对我学业上的悉心指导和严格要求, 及生活无微不至的关心、照顾和理解。感谢庞荣清副主任和阮光萍博士后、蔡学敏博士在专业技术上的指导和帮助! 感谢吕燕波博士、石琳琳、何洁、赵晶、马丽花、王金祥、王强、朱向情给予我的关心和帮助!

作者贡献: 第一、二作者构思并设计本综述, 第一作者解析相关数据, 所有作者共同完成专业、技术分析整理, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 沃顿胶(Wharton jelly)-脐动脉管腔较小, 壁厚, 血管周围有胚胎结缔构造, 剔除血管和外膜后, 余下的胶冻状组织, 即沃顿胶。

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] Löhle M, Hermann A, Glaß H, et al. Differentiation efficiency of induced pluripotent stem cells depends on the number of reprogramming factors. *Stem Cells*. 2012;30(3):570-579.
- [2] Gifford Casey A, Ziller Michael J, Gu H, et al. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell*. 2013;153(5):1149-1163.

- [3] Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. Dermis isolated adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2012; 33(1):109-119.
- [4] Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells*. 2012; 30(1): 42-47.
- [5] Hao L, Sun HQ, Guo XS, et al. Exogenous gene expression in vitro and in vivo in bone marrow mesenchymal stem cells modified by hPDGF-A and hBD(2). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2009; 17(3):685-689.
- [6] Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2013; 22(6):1075-1086.
- [7] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21(1):105-110.
- [8] Kim DW, Staples M, Shinozuka K, et al. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(6):11692-11712.
- [9] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1330-1337.
- [10] Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005; 23(2):220-229.
- [11] Lu LL, Song YP, Wei XD, et al. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue and bone marrow. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008; 16(1):140-146.
- [12] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008; 32(7):724-732.
- [13] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118(23):1987-1993.
- [14] 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.
- [15] Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!. *Stem Cells*. 2007; 25(7):1603-1609.
- [16] Tsagias N, Koliakos I, Karagiannis V, et al. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfus Med*. 2011; 21(4):253-261.
- [17] Diao Y, Ma Q, Cui F, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009; 91(1):123-131.
- [18] Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol*. 2009; 90(2):261-269.
- [19] Schultz SS, Lucas PA. Human stem cells isolated from adult skeletal muscle differentiate into neural phenotypes. *J Neurosci Methods*. 2006; 152(1-2):144-155.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol*. 2008; 86:101-119.
- [23] 齐凯, 董丽媛, 陈显久, 等. 人脐带来源间充质干细胞分离培养方法的优化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(23): 4220-4224.
- [24] Chazotte B. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor protocols*. 2011; 2011(1):pdb prot5556.
- [25] Hu KX, Wang MH, Fan C, et al. CM-Dil labeled mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(9):1265-1270.
- [26] Shao-Fang Z, Hong-Tian Z, Zhi-Nian Z, et al. PKH26 as a fluorescent label for live human umbilical mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011; 47(8):516-520.
- [27] Godfrey WR, Krampf MR, Taylor PA, et al. Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood*. 2004; 103(3):1158-1165.
- [28] Castanheira P, Torquetti LT, Magalhas DR, et al. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. *Cell Transplant*. 2009; 18(4): 423-431.
- [29] Schmidt H, Rathjen FG. Dil-labeling of DRG neurons to study axonal branching in a whole mount preparation of mouse embryonic spinal cord. *J Vis Exp*. 2011; (58):pii: 3667.
- [30] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2008; 29(15):2378-2387.
- [31] Chadli L, Cadio E, Vaigot P, et al. Monitoring the cycling activity of cultured human keratinocytes using a CFSE-based dye tracking approach. *Methods Mol Biol*. 2013; 989:83-97.
- [32] Urbani S, Caporale R, Lombardini L, et al. Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2006; 8(3):243-253.
- [33] Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*. 2002; 297(5588):1873-1877.
- [34] Liu Y, Xue M. Recombinant human insulin gene lentivirus transfecting human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi*. 2010; 24(7): 822-827.
- [35] Tang L, Chang J. Effect of GFP-containing lentivirus infection on the expression of octamer transcription factor 4 in human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2013; 29(3):292-296.