

脐带间充质干细胞在不同培养体系条件下的生物学特性

周建宇, 徐悦, 黄文敬, 刘俊江, 洪敬欣(协和干细胞基因工程有限公司, 天津市 300384)

文章亮点:

- 1 利用组织块贴壁法成功获得贴壁生长的人脐带间充质干细胞, 并在体外扩增传代培养。
- 2 用含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基、含体积分数 5%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基、Mesen PRO RSTM 培养基培养同一代次脐带间充质干细胞, 结果显示含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中的细胞集落密集程度和形态优于其他两种培养基。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 培养基; 脐带间充质干细胞; 诱导分化

主题词:

干细胞; 脐带; 间质干细胞; 培养基

摘要

背景: 体外培养的脐带间充质干细胞在不同培养体系下生长状态差异显著, 因此选取一种更适合的培养基相当必要。

目的: 对比观察人脐带间充质干细胞在 3 种培养基中的生长增殖情况, 并检测细胞免疫表型以及间充质干细胞的诱导分化能力。

方法: 在无菌条件下用贴块法收获人脐带间充质干细胞, 用 T75 培养瓶培养传代后, 取第 3 代脐带间充质干细胞分别种入到含体积分数为 5%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基、含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基和 Mesen PRO RSTM 培养基中, 培养第 1, 3, 5, 7 天进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线。采用流式细胞仪分析第 3 代脐带间充质干细胞免疫表型, 并检测其成骨及成脂肪诱导分化能力。

结果与结论: 培养出的第 3 代人脐带间充质干细胞高表达 CD44、CD73、CD90、CD105, 不表达 CD29、CD31、CD34、HLA-DR。经成脂诱导后, 油红 O 染色可见胞浆中有大量红色小脂滴; 成骨诱导后, 茜素红染色后镜下可见成骨样细胞团, 说明脐带间充质干细胞在体外具有多向分化的潜能。在倒置显微镜下观察可见含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中的细胞集落密集, 形态均匀, 而其他 2 种培养基中的细胞集落密集程度和形态都不如前者好。在培养传代细胞时, 可优先选择含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。

周建宇, 徐悦, 黄文敬, 刘俊江, 洪敬欣. 脐带间充质干细胞在不同培养体系条件下的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(32):5114-5119.

Biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells in different conditioned media

Zhou Jian-yu, Xu Yue, Huang Wen-jing, Liu Jun-jiang, Hong Jing-xin (Union Stemcell & Gene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract

BACKGROUND: The growth of mesenchymal stem cells *in vitro* in different conditioned media is different evidently. So it is necessary to choose a more suitable medium.

OBJECTIVE: To contrast and observe the proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in three kinds of media and to check the immunophenotype and differentiation ability of mesenchymal stem cells.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were collected by explant method in sterile conditions. After subculturing by T75 incubation bottles, the third generation of mesenchymal stem cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 medium containing 5% fetal bovine serum, Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 containing 10% fetal bovine serum and Mesen PRO RSTM medium. After 1, 3, 5, 7 days of culture, the cells were counted to draw a growth curve. Immunophenotype of the third generation of umbilical cord mesenchymal stem cells were determined by flow cytometry and the ability of osteogenic and adipogenic differentiation was also detected.

RESULTS AND CONCLUSION: The third generation of cells cultured highly expressed CD44, CD73, CD90, CD105, but did not express CD29, CD31, CD34, HLA-DR. The oil red O staining showed a lot of little red lipid drops after adipogenic induction; alizarin red staining showed osteoblast-like cells after osteogenic induction, indicating umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* have the potential of multi-directional differentiation. After observation and counting, the colony and shape of cells cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 containing 10% fetal bovine serum were superior to those cultured in the

周建宇, 男, 1983 年生, 天津市人, 汉族, 助理工程师, 主要从事间充质干细胞方面的研究。

通讯作者: 洪敬欣, 博士后, 协和干细胞基因工程有限公司, 天津市 300384

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.32.006
[http://www.crter.org]

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2014)32-05114-06
稿件接受: 2014-07-14

Zhou Jian-yu, Assistant engineer, Union Stemcell & Gene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China

Corresponding author: Hong Jing-xin, M.D., Union Stemcell & Gene Engineering Co., Ltd., Tianjin 300384, China

Accepted: 2014-07-14

other two media. Therefore, it is concluded that Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F-12 containing 10% fetal bovine serum is preferred for cell subculture.

Subject headings: stem cells; umbilical cord; mesenchymal stem cells; culture media

Zhou JY, Xu Y, Huang WJ, Liu JJ, Hong JX. Biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells in different conditioned media. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(32):5114-5119.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞, 体外可以分化成多种细胞, 包括成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经细胞等^[1-4]。目前间充质干细胞的主要来源是成人骨髓, 但是成人骨髓源间充质干细胞可随年龄增长而致干细胞扩增、分化能力显著降低, 并且存在高度病毒污染的可能, 且间充质干细胞的采集需行骨髓穿刺, 使其来源受限^[5-7]。最近的研究表明, 人脐带的结缔组织是间充质干细胞最丰富的组织来源。脐带中动脉与静脉之间含有特殊的胚胎黏液样结缔组织华氏胶组织, 从脐带华氏胶中可分离到间充质干细胞^[8-9]。McElreavey等^[10]首次发现人脐带组织中存在大量间充质干细胞以来, 人们采用组织贴块法和酶消化法分离到了大量脐带间充质干细胞, 显著促进了脐带间充质干细胞的研究。人脐带间充质干细胞具有取材方便、易于获得、不存在伦理问题、免疫系统的原始性降低了移植后受者发生排斥反应的概率^[11-12]、不被细胞毒性T细胞和NK细胞杀伤以及免疫调节作用等特点^[13-14]。脐带间充质干细胞在治疗一些自身免疫疾病及退行性病变等方面具有极高的临床价值^[15-22]。诸多优点使其应用前景更为广泛, 成为当今干细胞研究热点^[23]。

实验室在培养脐带间充质干细胞的过程中选择合适的培养基极其重要。不同的培养基配方对细胞生长活性有着重要的影响。本实验采用含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基、含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基和Mesen PRO RSTM培养基培养第3代脐带间充质干细胞, 通过种板计数观察细胞在3种培养基中的生长情况, 并检测细胞免疫表型以及间充质干细胞的诱导分化能力。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 实验于2012年6月至2013年5月在协和干细胞基因工程有限公司实验室完成。

材料: 经产妇同意, 无菌条件下采集足月健康胎儿脐带50份。采集前产妇进行艾滋病病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、梅毒螺旋体抗体及支原体检测, 均为阴性。标本采集后4℃冰箱保存, 12 h后处理。

实验方法:

人脐带间充质干细胞的分离: 在无菌条件下采集脐带约10 cm, 用PBS冲洗, 并将血管剥离。将血管周围的脐带组织剪成1.0–2.0 mm³大小的组织块15块左右, 贴于T75培养

瓶底层, 翻转培养瓶, 顺着培养瓶顶层加入含体积分数为15%胎牛血清的DMEM/F12培养基3 mL, 随后将培养瓶底层朝上放入体积分数为5%CO₂, 37℃的培养箱中。6 h后翻转培养瓶并轻轻摇动, 使培养液和每个组织块充分接触。然后将培养瓶底层朝下放回孵箱培养。每3 d更换培养液。

脐带间充质干细胞生物学特性检测实验用主要试剂与仪器:

试剂和仪器	来源
地塞米松、吡喹酮、油红O、IBMX、胰岛素	Sigma, 美国
Mesen PRO RS TM 培养基、DMEM/F12培养基、TrypLE TM Select(1×)	Gibco, 美国
倒置显微镜	Olympus, 日本
离心机、流式细胞仪	Beckman, 美国
胎牛血清	PAA, 奥地利
CO ₂ 培养箱	Thermo, 美国

原代及传代培养: 当镜下观察多个组织块周围有细胞爬出并成集落时, 把组织块除去, 加入TrypLETM Select(1×)消化后, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中和, 离心后去上清, 用PBS洗涤后, 将细胞按1×10⁴/cm²传代培养。

第3代细胞接种于3种培养基后的培养: 待T75瓶中的第3代细胞培养到集落60%融合, 用TrypLETM Select(1×)消化后收获细胞。取24孔板, 以细胞密度为1×10³/孔分别种入到含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基、含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基和Mesen PRO RSTM培养基中, 每种培养基做3个复孔, 每孔体积为1 mL。做4份同样的24孔板使细胞生长到第1, 3, 5, 7天时得以观察细胞形态及计算当天的细胞数。

生长曲线的测定: 在接种后第1, 3, 5, 7天分别将24孔板3种培养基培养后的细胞消化并人工计数, 记录数据, 取平均值, 绘制细胞生长曲线。

细胞免疫表型的测定: 常规消化细胞后, 用PBS洗涤2次, 制成1×10⁹ L⁻¹单细胞悬液, 0.1 mL/管, 同型对照管用IgG-PE, 其他管分别加入CD34-PE, CD105-PE, CD73-PE, CD90-PE, CD-44PE, HLA-DR各20 μL, 孵育30 min后, 用流式细胞仪测定细胞免疫表型的表达。

脐带间充质干细胞向脂肪细胞诱导分化: 取第3代细胞, 以1×10⁷ L⁻¹浓度接种于6孔板内, 用含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基3 mL培养至细胞融合达80%时去掉培养液, 洗涤后, 加入含1 μmol/L地塞米松、

10 mg/L胰岛素、100 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛、0.5 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤和体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12的诱导液。每三四天换液1次, 连续诱导18 d, 吸出诱导液, 用PBS洗2次, 40 g/L多聚甲醛固定, 油红O染色15 min。另设一阴性对照孔, 以相同细胞浓度接种, 用含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养, 始终不换诱导液。

脐带间充质干细胞向骨细胞诱导分化: 取第3代细胞, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种到6孔板中, 加入含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基3 mL培养, 待细胞融合达60%时去掉培养液, PBS洗涤后, 加入含有0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油、50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸和体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12的诱导液诱导, 每三四天换液1次。诱导3周后, 用茜素红染色。另设一阴性对照孔, 以相同细胞密度接种, 用含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养, 始终不换诱导液。

主要观察指标: ①3种培养基培养的细胞形态。②生长曲线的分析。③免疫表型的分析。④细胞成脂肪、成骨能力的鉴定。

统计学分析: 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞的形态 原代培养8 d后贴壁组织块周围爬出成纤维状细胞(图1A)。第3代细胞用3种培养基培养5 d后, 在倒置显微镜下观察可见细胞均贴壁呈梭型、多角形, 呈平行排列生长或漩涡状生长。含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中的细胞集落密集, 形态均匀, 而含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基和Mesen PRO RSTM培养基中的细胞集落密集程度和形态都不如前者好(图1B, C, D)。

2.2 三种培养基培养后细胞的生长曲线 使用3种培养基培养7 d后, 用血球计数板镜下计数, 生长趋势由好到差依次为含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基、含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基、Mesen PRO RSTM培养基(图2)。

2.3 人脐带间充质干细胞免疫表型鉴定 流式细胞仪检测结果显示, 细胞强表达CD44, CD73, CD90, CD105, 阳性率分别为100%, 96.86%, 99.34%, 100%; 不表达CD29, CD31, CD34, HLA-DR, 阳性率分别为0.21%, 0.04%, 0.16%, 0.13%(图3)。

2.4 细胞向成脂分化的鉴定 经过油红O染色, 在镜下可以看到很多胞浆中充满红色油滴, 说明间充质干细胞在诱导条件下可以向脂肪细胞转化(图4A)。未加入诱导液的细胞染色后看不到红色油滴(图4B)。

2.5 细胞向成骨分化的鉴定 第3代脐带间充质干细胞在相应诱导培养条件下, 能向成骨细胞分化, 茜素红染色后

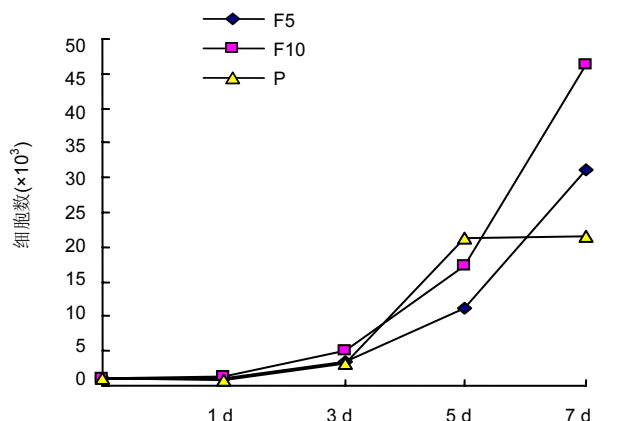


图2 三种培养基培养条件下细胞增长趋势图

Figure 2 The tendency chart of cell growth in three kinds of culture media

图注: 生长趋势由好到差依次为含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基(F10)、含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基(F5)、Mesen PRO RSTM培养基(P)。

可以看到骨节状成骨细胞(图4C)。阴性对照组未观察到有成骨状分化(图4D)。

3 讨论 Discussion

目前, 人脐带间充质干细胞主要分离自脐带的Wharton's 胶及脐静脉内皮下层。可通过酶消化脐静脉内膜或联合消化脐带华通式胶法以及组织块直接培养法获得^[24-26]。贴块法是分离脐带间充质干细胞的基本方法, 通常将脐带剪成若干块体积为几立方毫米的小块后, 转移至含有多种生长因子的培养液中培养^[27], 或用酶消化几个立方毫米的小块后再直接用含体积分数为20%胎牛血清的培养液培养^[28], 就可以分离到脐带间充质干细胞。王菲等^[29]分离新鲜脐带10根, 分别采用组织块法、酶消化法、酶解组织块法3种方式培养人脐带间充质干细胞, 结果可见酶解组织块培养法原代人脐带间充质干细胞爬出所需时间与酶消化法无显著差异, 但明显短于组织块法($P < 0.01$), 原代人脐带间充质干细胞培养成功率显著高于其他两组, 人脐带间充质干细胞增殖情况3组无显著性差异, 酶解组织块培养法培养的第3代人脐带间充质干细胞表面标志及多项分化能力符合间充质干细胞的特性。提示酶解组织块培养法能缩短原代人脐带间充质干细胞爬出时间, 显著提高原代人脐带间充质干细胞的成功率。李艳琪等^[30]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, 结果表明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。人脐带间充质干细胞相对于骨髓间充质干细胞具有明显的优越性^[31-37], 具有来源广泛、不受伦理限制、病毒感染的概率小、对供者和患者无不良影响等优点。本实验采用组织块贴壁法成功获得贴壁生长的人脐带间充质干细胞并在体外扩增培养。培养出的细胞均能贴壁生长, 并呈现梭形, 呈集落生长。

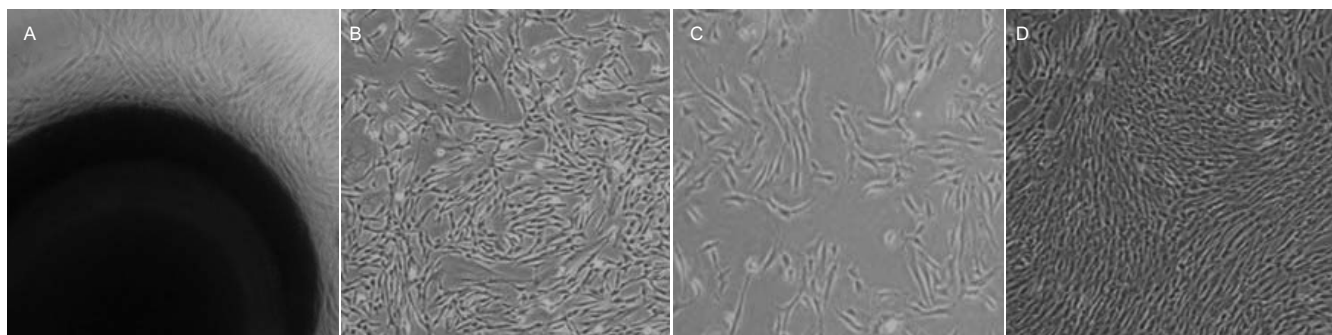


图 1 人脐带间充质干细胞的形态

Figure 1 The morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为贴块法培养获得的人脐带间充质干细胞, 培养 10 d 后可见成纤维样细胞从植块边缘爬出, 形成克隆($\times 40$); B 为第 3 代细胞在含体积分数为 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养第 5 天, 细胞达 50%–60% 融合, 细胞呈长梭形分布排列($\times 40$); C 为第 3 代细胞在 Mesen PRO RS™ 培养基中培养第 5 天, 细胞融合度不足 40%, 细胞呈多角形类内皮样细胞形状, 镜下折光率较高($\times 40$); D 为第 3 代细胞在含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养第 5 天, 细胞呈长梭形紧密排列成漩涡状, 融合率超过 80%($\times 40$)。

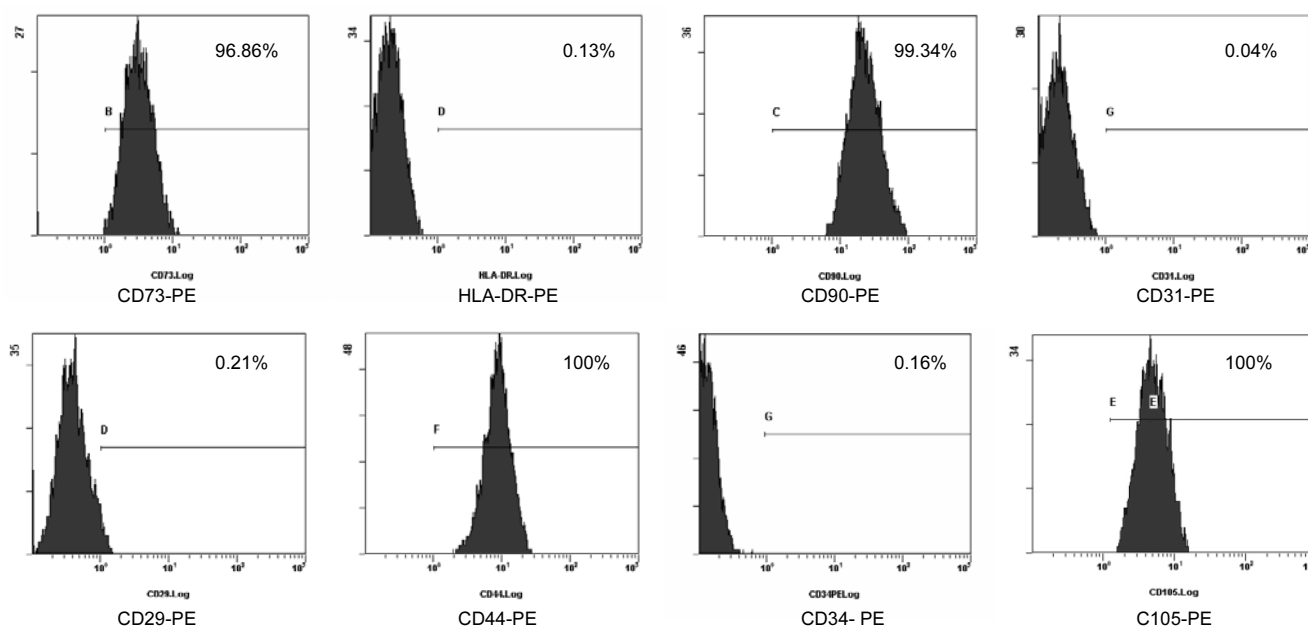


图 3 人脐带间充质干细胞免疫表型鉴定

Figure 3 Immunophenotypes of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 人脐带间充质干细胞强表达 CD44, CD73, CD90, CD105, 不表达 CD29, CD31, CD34, HLA-DR。

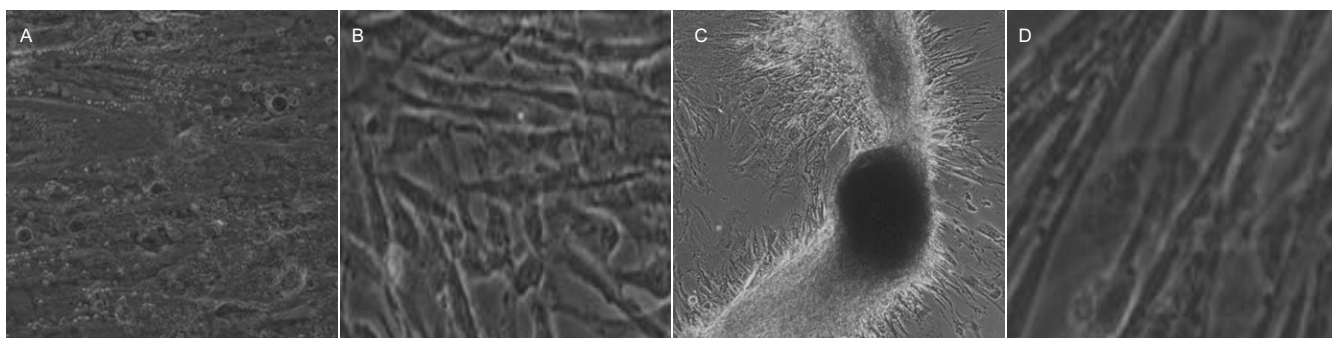


图 4 第 3 代脐带间充质干细胞成脂成骨诱导分化能力

Figure 4 The adipogenic and osteogenic differentiation ability of the third generation of umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: A 为油红 O 染色后, 在镜下可以看到很多胞浆中充满红色油滴, 说明间充质干细胞在诱导条件下可以向脂肪细胞转化($\times 200$); B 为成脂诱导阴性对照组, 细胞染色后看不到红色油滴($\times 200$); C 为茜素红染色后, 在镜下可以看到骨节状成骨细胞, 说明间充质干细胞在诱导条件下可以向成骨细胞转化($\times 400$); D 为成骨诱导阴性对照组, 未观察到有成骨状分化($\times 400$)。

体外培养间充质干细胞需要把分离出的原代细胞置于培养瓶中贴壁培养。其基本条件是要使培养瓶的内环境模拟成人或动物的体内环境, 否则细胞难以正常生长。除了要在无菌环境下以外, 还要给细胞提供适当的温度、湿度、渗透压、pH值及所必需的营养物质。其中最关键的便是细胞生长所必需的培养基(液)。如今间充质干细胞通常都是用人工合成的培养基培养, 其成分就是模拟体内环境的营养成分, 即糖、氨基酸、无机盐、促生长因子、微量元素等。但是由于体内环境某些成分尚未研究清楚, 所以配制培养液时通常要在合成培养基加入血清、血浆等一些天然成分以提供细胞所需营养物质和促进细胞贴壁生长的微量物质。

对于培养脐带间充质干细胞来说, 选择一种合适的培养基至关重要。如今合成培养基种类甚多, 其成分不尽相同, 通常分为有血清和无血清培养基。对于需要加入血清的合成培养基, 不同的血清种类和浓度对细胞生长影响较大。目前在培养脐带间充质干细胞方面, 培养基还没有绝对统一的标准选择。为了探索出一种更适合间充质干细胞生长的培养基, 本实验选取了两种代表性的合成培养基DMEM/F12和Mesen PRO RSTM。由于DMEM/F12需要另加入血清, 所以设计了两种血清浓度, 即体积分数为5%和体积分数为10%, 且选择的是胎牛血清。然后利用3种培养基培养分离出的脐带间充质干细胞, 通过观察细胞形态以及制作生长曲线来鉴定哪种培养基最适合脐带间充质干细胞的生长。

通过生长曲线对比3种培养基对第3代人脐带间充质干细胞生长的影响, 发现用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养的细胞, 形态和增殖能力均优于含体积分数为5%胎牛血清的DMEM/F12培养基和Mesen PRO RSTM培养基。培养传代细胞可优先选择含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基。

间充质干细胞能表达多种表面抗原, 但是没有特异表达的抗原。根据以前的文献得知, 表面抗原表达阳性的有CD73、CD90、CD105等, 而造血干细胞标记CD14、CD34、CD45、HLA-DR等表达为阴性。本实验选择了其中几个代表性的抗原做分析, 通过流式细胞仪测定细胞高表达CD44、CD90、CD105, 不表达HLA-DR、CD29、CD31、CD34, 证明本实验培养的细胞非造血干细胞来源, 均与文献一致^[38-39]。

在成脂诱导18 d左右, 细胞出现小脂滴, 说明了间充质干细胞在诱导条件下可向脂肪细胞转化。在成骨诱导21 d后, 染色为阳性反应, 镜下观察有向骨细胞转化的现象。由于没有鉴定脐带间充质干细胞的特异表面抗原, 其向多种间质组织细胞如脂肪细胞, 骨细胞诱导分化的多向分化潜能被认为是最有利的证据^[40]。

实验中用3种培养基培养第3代脐带间充质干细胞, 经过实验得出含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养

基为传代后细胞培养的最适培养基。由于条件有限, 本实验没有对比更多的培养基, 在以后实验中需要多做几种对照(比如不同血清浓度以及不同种血清甚至无血清培养基等等), 以期选择最好的一种。

间充质干细胞的可诱导性使得它在医学上的应用备受瞩目。应用间充质干细胞作为种子细胞治疗肝硬化、糖尿病、肿瘤等疾病成为目前科学界研究的重点, 目前已有不少在动物实验中取得的成功案例, 但是应用到人体还需要进一步研究其作用机制。脐带由于取材方便, 无伦理限制, 内含丰富的间充质干细胞而成为当下间充质干细胞来源的最佳途径, 为以后的科研和临床应用打下了重要的基础。

作者贡献: 实验设计为周建宇, 实验实施为周建宇, 实验评估为洪敬欣, 资料收集为徐悦。周建宇成文, 黄文敬审校, 周建宇对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 经产妇同意, 无菌条件下采集足月健康胎儿脐带。实验方案获得医院伦理委员会批准。

学术术语: Mesen PRO RSTM是一种减血清(体积分数为2%)培养基, 适用于培养体系中人间质干细胞的生长。Mesen PRO RSTM培养基包括液体基础培养基和使用前临时加入的冻存添加剂(Mesen PRO RSTM生长添加剂)。

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] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [2] Kang XQ, Zang WJ, Song TS, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005;11(22):3479-3484.
- [3] Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*. 2002; 69(6): 880-893.
- [4] Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3016-3020.
- [5] 裴雪涛. 干细胞实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 2006: 83.
- [6] Bertani N, Malatesta P, Volpi G, et al. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 17):3925-3936.
- [7] Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):713-734.
- [8] Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24(1):115-124.
- [9] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008;26(3):591-599.

- [10] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans.* 1991;19(1):29S.
- [11] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int.* 2008;32(1):8-15.
- [12] Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab.* 2007;53(1-2):81-84.
- [13] Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5(6):485-489.
- [14] Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 2008;36(6):733-741.
- [15] 李艳芬, 孙兰军, 赵英强, 等. 复方丹参滴丸干预骨髓间充质干细胞移植后心肌再生的实验研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(9):81-83.
- [16] 丰干钧, 刘浩, 邓力, 等. 构建椎间盘组织工程的人骨髓间充质干细胞的分离及三维培养[J]. 生物医学工程学杂志, 2009, 26(6):1300-1305.
- [17] 段征, 陈晓云, 徐艳华, 等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠溃疡性结肠炎的修复[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(23):2761-2764.
- [18] 吴力克, 王晓娟, 褚赛纯, 等. 脐血间充质干细胞移植治疗帕金森病30例[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40):7951-7954.
- [19] 刘蒙, 杨少光, 刘鹏霞, 等. 人骨髓和脐带来源间充质干细胞体外支持造血能力的比较研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(5):1294-1300.
- [20] 陆华, 苗宗宁, 吴卫江, 等. 人骨髓间充质干细胞的免疫调节作用及向神经元样细胞诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(45):8955-8960.
- [21] 陈新, 华建媛, 石庆之. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血T细胞的调节作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40):7908-7912.
- [22] 赵艳梅, 钟国强, 李金铁, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞移植急性心肌梗死大鼠缝隙连接蛋白43及缝隙连接蛋白45 mRNA的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(45):8895-8900.
- [23] Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, et al. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(7):394-399.
- [24] 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.
- [25] 李德华, 单伟, 郑晓明, 等. 人脐静脉间充质干细胞体外诱导分化为神经元的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(8):1472-1476.
- [26] 王爱红, 何红燕, 罗敏洁, 等. 人脐带间充质干细胞向胰岛样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(21):4102-4106.
- [27] 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.
- [28] 毛希宏, 杨智勇, 孟明耀, 等. 人脐带间充质干细胞的培养鉴定及其向神经元细胞分化的研究[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(1):41-47.
- [29] 王菲, 周洪, 郭显成, 等. 原代人脐带间充质干细胞培养方法的研究[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(19):3042-3047.
- [30] 李艳琪, 王洪一, 姚尧, 等. 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 2007;25(2):319-331.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Chen MY, Lie PC, Li ZL, et al. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2009;37(5):629-640.
- [38] 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.
- [39] 张利, 张俊杰, 林勇辉, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养及初步鉴定[J]. 同济大学学报:医学版, 2009, 30(1):32-34.
- [40] Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(2):131-145.